Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNG POLYCYCLISCHER KOHLENWASSERSTOFFE IM ZELLTRANSFORMATIONSTEST NACH STYLES

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von

Dr. rer. nat. WOLFGANG GREB

1980

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543926_0105

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie
an der Universität Düsseldorf
(Direktor: Prof. Dr. G. Röhrborn)

UNTERSUCHUNG POLYCYCLISCHER KOHLENWASSERSTOFFE IM ZELLTRANSFORMATIONSTEST NACH STYLES

DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät der Universität
Düsseldorf

vorgelegt von
Dr. rer. nat. WOLFGANG GREB

1980

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez.: Prof. Dr. Krüskemper

Referent
gez.: Prof. Dr. Röhrborn

Korreferent
gez.: Prof. Dr. Ohnesorge

Druck: aku-Fotodruck, Gleueler Str. 217,
5000 Köln 41, Tel. 0221/437257

INHALT

		Seite
1.	Einleitung	1
1.1	Herkömmliche Tests auf Kanzerogenität	2
1.2	Zelltransformation in vitro	5
2.	Problemstellung	8
3.	Material und Methoden	9
3.1	Testsubstanzen und Reagenzien	9
3.2	Zellen und Kulturmedien	13
3.3	Zellkultur	15
3.4	Zelltransformationstest	16
4.	Ergebnisse	19
4.1	Veränderte Testmethodik	19
4.2	Reproduktion der Ergebnisse von Styles mit Standard-Karzinogenen	20
4.3	Prüfung von polycyclischen Kohlenwasserstoffen	28
5.	Diskussion	37
5.1	Bewertung der Ergebnisse und Vergleich mit Resultaten aus anderen Transformations-Tests	37
5.2	PCK-Resultate in anderen Testsystemen	43
5.3	Interpretation und Bedeutung des Zelltransformations-Tests	47
6.	Zusammenfassung	51
7.	Literatur	52
8.	Tabellen mit Einzelwerten	62
	Danksagung	68
	Lebenslauf	69

1. Einleitung

Seit P. Pott (1775) ist bekannt, daß Chemikalien Krebs verursachen können, jedoch fällt es der Toxikologie als der zuständigen Wissenschaft bis heute schwer, die kanzerogene Wirkung einer Substanz vorherzusagen oder zu beweisen. Pott schilderte den kanzerogenen Effekt einer Stoffklasse, die unter dem Sammelbegriff polycyclische Kohlenwasserstoffe (PCK) bekannt ist und deren Vorhandensein in Ruß, Pech, Steinkohlenteer, Mineralöl und Abgasen Umweltprobleme schafft.
Die Exposition des Menschen findet über die Atemluft durch Abgase und Tabakrauch und über die Nahrungsaufnahme statt. Besonders in industrie- und verkehrsdichten Zonen enthalten die Böden und die auf ihnen gewachsenen Früchte und Gemüse reichlich polycyclische Kohlenwasserstoffe (Engst und Fritz 1975). Als hoch wirksamer und wichtigster Vertreter dieser Substanzen wurde Benz(a)pyren identifiziert (Kennaway und Hieger 1930). Es wird geschätzt, daß z.B. jeder DDR-Bürger zwischen 24 und 85 mg dieser Verbindung in seinem Leben aufnimmt (Fritz 1971).
Da es sich stets um Gemische von PCK handelte, die von der Arbeitsmedizin als krebsauslösend beschrieben wurden, bleibt die Frage der Kanzerogenität der Einzelsubstanzen am Menschen offen. Die unterschiedliche Potenz verschiedener PCK wird seit langem experimentell untersucht, doch ist die Anzahl der Testsubstanzen groß und die Aussagekraft der angewandten Methoden mehr oder weniger eingeschränkt.

1.1 Herkömmliche Tests auf Kanzerogenität

Der Nachweis der krebsauslösenden Wirkung einer Substanz läßt sich experimentell im Versuchstier erbringen. Trotz Eindeutigkeit des gemessenen Endpunktes gestalten sich Interpretation und Vergleich zwischen verschiedenen Versuchen oft schwierig, abhängig von der Qualität des Tests. Dazu gehört, daß man möglichst eine Spezies wählt, die die Substanz ähnlich metabolisiert wie der Mensch, daß man eine für die Versuchsdauer (Ratte 2 J, Maus 18 Mo) ausreichende Tierzahl einsetzt, so daß für die Statistik noch genug Tiere überleben, und daß die Applikationsform wenn möglich der Anwendung oder Exposition entspricht (Shubik 1974). Unter Standard-Bedingungen (NCI 1976) werden pro Gruppe und Geschlecht 50 Tiere auf 3 Dosierungen getestet. Mit Negativ- und Positiv-Kontrolle kommen so bei einer Spezies leicht 500 Tiere zusammen. Es sollten möglichst 2 Spezies untersucht werden. Man appliziert hohe Dosen in der Hoffnung auf eine geringere Latenzzeit des Tumors und nimmt dabei ernste Nebenwirkungen z.B. Probleme der Metabolisierung (Überlastung der Leber) oder der Ausscheidung (Bildung von Blasensteinen) in Kauf. Umstritten ist die Bedeutung benigner Tumoren (Shubik 1979).

Mit diesem Langzeitversuch gelingt es zwar z.B. die Kanzerogenität der bekannten Berufskrebs auslösenden Stoffe ausreichend sicher nachzuweisen (Henschler 1978), doch können Tumorraten mit einer geringen, dem Vorkommen einzelner menschlicher Krebsarten entsprechenden Inzidenz, nur mit sehr hohen Tierzahlen erfaßt werden. Die gleiche Bedingung muß aus statistischen Gründen gelten, will man praxisgerechte Konzentrationen einsetzen oder schwache Karzinogene erfassen (Schmähl u. Habs 1977).

Eine andere in vivo Methode stützt sich auf die Mehr-Stufen-Theorie des Krebses, die bei der Entstehung von Hauttumoren demonstriert wurde (Berenblum und Shubik 1949). Einmalige Pinselung von Mäusehaut mit karzinogenen Stoffen (Initiation) gefolgt von wiederholtem Auftragen eines Promoters (z.B. TPA) führt zum Auftreten von Hautkrebs (Van Duuren et al. 1970). Als Folge der lokalen Applikation und Auswertung bleiben mit dieser Methode jedoch für die Übertragbarkeit der Ergebnisse auf den Menschen wichtige Informationen über Pharmakokinetik, Organotropie und Metabolisierung unerkannt.

Angesichts der gefährlichen Wirkung krebsauslösender Stoffe bedeutet bereits der Verdacht auf diese Eigenschaft eine wichtige Information. Entscheidenden Fortschritt brachten hier die Experimente von Ames (1973), der auf die Fähigkeit im Tierversuch karzinogener Stoffe hinwies, in Histidin-Mangelmutanten von Salmonella typhimurium Rückmutationen zu erzeugen. Mit diesem preiswerten Bakterien-Test konnten viele, bis dahin unerkannte krebsverdächtige Substanzen als Mutagene ermittelt werden (McCann et al. 1975). Im Ames-Test und in vielen anderen Kurzzeit-Tests werden durch Chemikalien induzierte Mutationen, Reaktionen mit DNS oder Einflüsse auf die DNS-Reparatur gemessen (Übersichten bei: Stich 1975, Bridges 1976 und Schramm 1977). Solange die Ätiologie des Krebses noch unbekannt ist, muß versucht werden, die Kanzerogenität von der Wirkung her nachzuweisen. Testmethoden dieser Art sollten als Endpunkt den Tumor selbst haben oder durch Beobachtung von Krebszellen Hinweise darauf geben. Ansätze ergeben sich aus der Patho-Histologie, wo nach Implantation eines Stoffes in vivo (Westwood et al. 1979) oder Kultivierung von Gewebestücken in vitro (Richter-Reichhelm u. Emura 1978) frühe Veränderungen

an Zellen und Gewebe verfolgt wurden oder können der Krebsforschung entliehen werden, wo man zur Untersuchung mechanistischer Probleme seit 1943 (Earle et al.) mit Zellkulturen arbeitet. Während die zuerst genannte Alternative sich gerade erst abzeichnet, ist die Technik der Zellkultur bereits etabliert.

1.2. Zelltransformation in vitro

In Kultur wachsen Zellen auf dem Boden eines Kulturgefäßes und bilden eine zusammenhängende Schicht von Einzelzellen. Ist die maximal mögliche Flächenausdehnung erreicht, hört das Wachstum auf. Zugabe eines geeigneten Karzinogens führt zur Ausbildung von morphologisch veränderten Zellen, deren Wachstum durch den Kontakt der Zellen nicht gestoppt wird und die sich äußerlich nicht von Tumorzellen unterscheiden lassen (Kernpolymorphie, Basophilie etc.). Diese transformiert genannten Zellen erzeugen nach Inokulation in syngene oder immunsupprimierte Tiere Neoplasien. Man spricht von maligner Transformation, wenn der Tumor die entsprechenden klinischen Kriterien wie Metastasierung etc. erfüllt. Transformation ist ein komplexer Prozeß, der in Stufen abrollt und möglicherweise Mutationen einschließt. Im Gegensatz zu normalen Zellen, die nur eine gewisse Zeit kultiviert werden können und dann absterben, teilen sich transformierte Zellen unbegrenzt weiter. Sie wachsen ungeordnet und ihre Oberfläche besitzt Eigenschaften von Tumorantigenen und fibrinolytische Aktivität (Barret und TS'o 1978). Durch chemische oder virale Transformation werden die Glykoproteine der Zellmembran verändert (Blumberg et al. 1976, Lage-Davila und Montagnier 1979). Es ist fraglich, ob dieser Effekt verantwortlich ist für den Verlust der Kontaktinhibition oder für ein weiteres Transformationskriterium, das Wachstum transformierter Zellen im Weichlager. Normale Zellen wachsen nur auf festen Oberflächen, transformierte dagegen vermehren sich auch im Schwebezustand, der z. B. durch Zugabe eines Verdickungsmittels zur Zellsuspension erreicht wird. Zellen, die im Weichlager wachsen, produzieren nach Inokulation mit hoher Wahrscheinlichkeit

Tumore im Versuchstier (DiMayorca et al. 1973). Umgekehrt bilden aus Geschwülsten entnommene menschliche Tumorzellen Kolonien im Agar (Courtenay 1978). Mit der Zeitraffertechnik konnten Hosaka et al. (1979) Bewegungen von Ratten-Tumorzellen in einer Agarkolonie studieren, die einer für die Metastasierung notwendigen Diapedese ähnelten. Von allen bekannten Transformationskriterien in vitro wird der Fähigkeit, im Agar Kolonien zu bilden, die höchste Korrelation zur Tumorbildung in vivo zugeschrieben (Kakunaga und Kamahora 1968).
Im Rahmen der Krebsforschung sind auf dieser Basis Transformationstests entwickelt und mit Strahlen, Viren und Standard-Karzinogenen an verschiedenen Zellstämmen durchgeführt worden (Übersicht bei Heidelberger 1975). Durch die Intensivierung toxikologischer Untersuchungen in den letzten Jahren sind diese Versuche als Vortests auf Kanzerogenität für die Routine-Toxikologie interessant geworden. Purchase et al. (1976, 1978) und danach Pienta et al. (1977) haben durch Prüfung von mehreren hundert Substanzen den routinemäßigen Einsatz der Zellkultur gezeigt und die Validität ihrer Systeme beschrieben. Die Publikationen von Purchase, Styles et al. (1976) und Styles (1977) waren besonders interessant, weil in der Methodik käufliche Zellen benutzt wurden und der Test sehr einfach erschien: Inkubation mit Testsubstanz im Reagenzglas und anschließendes Ausplattieren in Agarlösung.
Bei den verwendeten BHK 21/Cl 13-Zellen handelt es sich um eine permanente Zellinie, das heißt, die Zellen sind näherungsweise "normal", vermehren sich aber immer weiter. Die ursprüngliche Kultur wurde im März 1961 in Glasgow angelegt aus den gepoolten Nieren 1 Tag alter syrischer Hamster vom Wurf Nr. 21, daher die Bezeichnung Baby Hamster Kidney 21. Nach 65 Tagen Züchtung wurde plötzlich

ein verstärktes Wachstum festgestellt und daraus der Klon (Cl) 13 isoliert (Stoker und MacPherson 1964). Die aneuploiden Zellen haben eine einheitliche Kernmorphologie und eine spindelförmige Fibroblastenform. Sie wachsen in ausgefransten Kolonien, die aus Bündeln orientiert liegender Zellen zusammengesetzt sind. BHK-Zellen wurden schon früher in Transformationsversuchen eingesetzt, z.B. erfolgte Transformation durch Behandlung mit Nitrosaminen (DiMayorca et al. 1973), Kalziumchromat (Fradkin et al. 1975), mit BK-Virus (Major und DiMayorca 1973) und UV-Strahlung (Ishii et al. 1977).

2. PROBLEMSTELLUNG

Wie bereits erwähnt haben einige Autoren mit Erfolg BHK-Zellen transformiert und das Wachstum im Weichagar als relevantes Transformationskriterium etabliert. Wegen der außerordentlich großen Bedeutung von "Kurzzeittests" für Karzinogene entschlossen wir uns, den Test von Styles auf seine Reproduzierbarkeit und Praktikabilität bei der Untersuchung potentieller Karzinogene zu erproben.
Dazu mußten in der vorliegenden Arbeit die Zellkultur und der Transformationstest zunächst aufgebaut und anhand einiger Standard-Karzinogene die Ergebnisse von Styles reproduziert werden. Ziel der Arbeit war es ferner, den Transformationstest gegebenenfalls so zu verändern, daß er in der Routinetestung Anwendung finden kann. Mit der gewonnenen Testerfahrung sollten dann einige polycyclische Kohlenwasserstoffe getestet werden, bei denen als Bestandteil verschiedener PCK-Mischungen Verdacht auf Kanzerogenität für den Menschen besteht.

3. Material und Methodik

3.1 Testsubstanzen und Reagenzien

Mit den folgenden Substanzen, deren Reinheitsgrad und Hersteller in der Tabelle 1 aufgeführt sind, wurde der CTT durchgeführt:

Substanz (Synonym u. Abkürzung)	Hersteller	Reinheit
Methansulfonsäuremethylester (Methylmethansulfonat, MMS)	Merck	z.Synthese
Methansulfonsäureethylester (Ethylmethansulfonat, EMS)	Merck	z.Synthese
Cyclophosphamid (Endoxan^{R})	Asta-Werke	
Mitomycin C	Medac	
Benz(a)pyren (3,4-Benzpyren, B(a)P)	Sigma	
Benz(e)pyren (1,2-Benzpyren, B(e)P)	Biochem. Inst. f. Umweltkarcinogene, Ahrensburg	99 %
Benz(b)fluoranthen (3,4-Benzfluoranthen, B(b)F)	"	99 %
Chrysen (Benz(a)phenanthren, CH)	"	
Anthracen (AC)	Serva	pro analysi
Benz(a)anthracen (1,2-Benzanthracen, BA)	Sigma	Grad II
Dibenz (a,h)anthracen (1,2:5,6-Dibenzanthracen, DBA)	Fluka	purissimum
Phenanthren (PA)	Merck	z.Synthese
20-Methylcholanthren (MC) (auch 3-MC)	Fluka	purissimum
9,10-Dimethylanthracen DMA)	Sigma	
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	pro analysi

Tabelle 2 enthält Angaben über benutzte Reagenzien.

Reagenz	Hersteller
DMEM = Dulbecco's Modifikation von Eagle's Medium (Trockenpulver f.1l, mit Glutamin ohne $NaHCO_3$)	Flow
MEM Dulbecco (1x) mit 3,7 g/l $NaHCO_3$, ohne Glutamin	Seromed
MEM Spinner-Medium mit L-Glutamin, ohne $NaHCO_3$	Seromed
Kanamycin 5 mg/ml	Seromed
Penicillin/Streptomycin 10.000 E / 10.000 µg/ml	Seromed
L-Glutamin (100x) (200 mM)	Seromed
Foetales Kälberserum mycoplasma and virus screened	Flow
Foetales Kälberserum M.-D. getestet	Seromed
Natriumhydrogencarbonat p.a.	Merck
PBS (phosphate buffered saline) ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}	Seromed
Hanks-Salze ohne $NaHCO_3$	Seromed
Agar Noble	Difco Lab.
Hepes-Puffer (1M, pH 7.3)	Gibco Bio-Cult
Trypsin 0.25 %ig in PBS ohne Ca^{2+}, Mg^{2+}	Seromed
NADP 98 %	Boehringer/ Mannheim
D-Glucose-6-phosphat-Na_2 Salz	"

Reagenz	Hersteller
Magnesiumchlorid p.a.	Merck
Kaliumchlorid reinst	Merck
Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Arochlor 1254	Analabs
PPLO-Agar	Difco Labs
Pferde-Serum	Flow
Hefe-Extrakt	Gibco
essentielle Vitamine	Gibco
Arginin	Merck
D(+)-Glucose	Merck

Das zur metabolischen Aktivierung benutzte System S-9 mix enthielt folgende Komponenten (B.N.Ames 1975):

$MgCl_2/KCl$ - Stammlösung:

0,4 mol $MgCl_2$ = 8,132 g
1,65 mol KCl = 12,30 g auf 100 ml aqua bidest

Phosphat-Puffer pH 7,4:

Na_2HPO_4 25,427 g/l lösen, pH mit NaH_2PO_4-Lösung (22,28 g/l) einstellen.

Glucose-6-phosphat-Stammlösung:

716,4 mg G-6-p in 2 ml aqua bidest lösen

Kofaktor-Lösung für 2 ml S-9 mix:

8 µmol NADP = 66,5 mg
+ 400 µl $MgCl_2/KCl$-Lsg.
+ 100 µl G-6-p-Lsg.
+ 1,5 ml Phosphat-Puffer

Lösung steril filtrieren durch Millipore-Spritzenaufsatz 0,2 µm

S-9-mix

1 ml Leberhomogenat von Arochlor 1254 induzierten Ratten (gelagert bei -80°C) wurde aufgetaut und mit
1 ml Kofaktor-Lösung versetzt.

3.2 Zellen und Kulturmedien

Die Zellen, BHK 21/Cl 13 wurden von der Fa. Flow bezogen (ATCC-No: CCl 10/ Best. Nr. 03-420), ebenso der zum Vergleich der Agar-Qualität benutzte Polyoma-transformierte BHK 21/Cl 13 Stamm PyY (Best. Nr. 03-602). Hela-Zellen wurden freundlicherweise vom Institut für Molekularbiologie, Klinikum Essen, zur Verfügung gestellt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in verschiedenen Medien, die unter unseren Bedingungen ein optimales Wachstum garantierten.

"Wachstums-Medium"

500 ml DMEM
20 ml Kanamycin
10 ml Penicillin/Streptomycin
10 ml Glutamin
50 ml foetales Kälberserum, Seromed

"survivor-Medium"

410 ml DMEM
20 ml Kanamycin
10 ml Penicillin/Streptomycin
10 ml Glutamin
100 ml foetales Kälberserum, Flow

"DMEM-Doppelmedium"

DMEM-Trockenpulver (für 1 l)
lösen in 240 ml aqua bidest.

4,4 g $NaHCO_3$
40 ml Kanamycin
20 ml Penicillin/Streptomycin
pH 7,0 mit 1n HCl einstellen, sterilfiltrieren

200 ml foetales Kälberserum, Flow

"Agar-Ansatz" 0,33 % Endkonzentration

990 mg Agar in 500 ml-Flasche einwiegen
135 ml aqua bidest zufügen, autoklavieren

"spinner-Medium"

MEM-Spinner (Trockenpulver für 1l)
lösen in 900 ml aqua bidest.

20 ml 1M Hepes-Lösung zufügen und
einstellen auf pH 7,0

3.3 Zellkultur

Zellzüchtung:

Alle verwendeten Zellinien sind sog. "Monolayer"-Kulturen, die an der Oberfläche von Glas oder vorbehandelten Plastikmaterialien festwachsen. Sie wurden in 150 cm^2 Zellkulturflaschen (Fa. Falcon) in 50 ml "Wachstumsmedium" bei 37°C unter 5 % CO_2/Luft - Atmosphäre gehalten. Nach Ausbildung eines zusammenhängenden Zellrasens - eine Flasche enthielt dann ca. 10 x 10^6 Zellen - wurden die Zellen durch milde Proteolyse von der Oberfläche abgelöst und verdünnt. Hierzu wurde das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit PBS ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} gespült, 30 Sekunden mit 5 ml Trypsin-Lösung versetzt, nach Abgießen 2 Minuten bei 37°C inkubiert und mit ca. 20 ml Medium unter Schütteln abgelöst. Die Zellen wurden resuspendiert und auf 5 neue Flaschen verteilt. Nach diesem Verdünnungsverhältnis von 1 : 5 war der Zellrasen innerhalb von 3 Tagen konfluent.

Um die Spontantransformationsrate der Zellen gering zu halten, wurde nach Bezug der Zellen durch 1 bis 2 Passagen ein ausreichender Vorrat angelegt, der in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Für alle Experimente wurden Zellen dieser Subkultur aufgetaut und höchstens 10 Passagen (entsprechend ca. 50 Zellgenerationen) lang verwendet.

Zellkonservierung: (Einfrieren und Auftauen)

Kulturflaschen mit 90 % konfluentem Zellrasen wurden trypsiniert, die Zellen 10 Minuten bei 50 g zentrifugiert und in "Wachstums-Medium" mit 10 % DMSO resuspendiert. Je 1,5 ml Zellsuspension (ca. 3 x 10^6 Zellen) wurden in

sterile Einfrierröhrchen abgefüllt und 4 Stunden im Einfrierstopfen abgekühlt, bevor sie in flüssigen Stickstoff eintauchten. (Stickstoffbehälter Fa. Messer-Griesheim).
Zum Auftauen wurden die Röhrchen schnell auf 37°C erwärmt und der Inhalt mittels steriler Spritze in eine 75 cm^2-Kulturflasche mit 50 ml Wachstums-Medium transferiert. Nach 24-stündiger Inkubation bei 37°C wurde das Medium gewechselt.

Mykoplasmenisolierung

Alle verwendeten Zellinien wurden in regelmäßigen Abständen durch Isolierungsversuche auf Mykoplasmenkontamination getestet. Zellproben in je 50 µl Medium wurden auf 2 %ige PPLO-Agar-Platten gebracht, die 20 % hitzeinaktiviertes Pferdeserum, 10 % Hefeextrakt, essentielle Vitamine, 10 mMol/l Arginin, 10 mMol/l Glutamin und 0,5 % D(+)-Glucose enthielten. Nach 6 bis 7 Tagen unter 95 % Stickstoff und 5 % Kohlendioxid wurden die Platten mit Diene's Lösung gefärbt und mikroskopisch auf dunkelblaue Kolonien untersucht. In keiner der getesteten Zellinien wurde Mykoplasmenkontamination beobachtet. Als positive Kontrolle in diesem Test wurde eine Mykoplasmen-verseuchte GMK Zellinie verwendet.

3.4. Zelltransformationstest

Eine ca. 90 % konfluente Kulturflasche wurde trypsiniert und die Zellen in Wachstums-Medium aufgenommen. Nach Zentrifugation (50 g, 10 Min.) wurde das Zellsediment in soviel Spinner-Medium resuspendiert, daß in 1 ml Medium ca. 250.000 Zellen enthalten waren. Die Zellen wurden mit der Neubauer-Kammer gezählt.

Von der in DMSO oder aqua bidest. gelösten Testsubstanz wurde eine Konzentrationsreihe hergestellt.
Je 1 ml Zellsuspension wurde in ein steriles, verschließbares Röhrchen mit einem Gesamtvolumen von 15 ml gegeben. Dazu wurden 50 µl S-9 mix und 10 µl Testsubstanz bzw. nur Lösungsmittel pipettiert. Von jeder Konzentration der Testsubstanz wurde eine Doppelbestimmung gemacht. Nach Durchmischen des Röhrcheninhalts wurde 3 bzw. 18 Stunden lang bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Bei einer 18stündigen Inkubationszeit wurde der Verschluß der Röhrchen durch eine halbe Drehung geöffnet.
Vor Beendigung der Inkubation wurde die gebrauchsfertige Agar-DMEM-Lösung hergestellt: 135 ml des vorbereiteten "Agar-Ansatzes" wurden aufgekocht und langsam auf 43°C abgekühlt. Gleichzeitig wurde DMEM-Doppelmedium auf 43°C erwärmt, und 135 ml wurden unter Rühren in den "Agar-Ansatz" gegeben und weiter bei 43°C gehalten. Diese Menge war für 24 Bestimmungen ausreichend. Nach beendeter Inkubation wurden die Zellen 10 Minuten bei 50 g sedimentiert und in 1 ml "survivor-Medium" resuspendiert. In jedes Röhrchen wurden 9 ml Agar-DMEM-Lösung gegossen und kräftig geschüttelt. Für den Toxizitäts-Test wurden 50 bzw. 100 µl der Zellsuspension in entsprechende Petrischalen (Ø 5 cm) pipettiert, in die zuvor 5 ml "survivor-Medium" gefüllt worden waren. Die restliche Zellsuspension wurde in Petrischalen für Bakterienzucht (Ø 5 cm) gegeben, die zur schnelleren Abkühlung des Agars auf kalten Metallplatten standen.
Die Schalen für den Toxizitätstest wurden zur gleichmäßigen Verteilung der Zellen im Medium leicht geschwenkt und anschließend zusammen mit den Schalen für den Transformationstest im CO_2-Brustschrank inkubiert.
Die Qualität der Agar-Mischung wurde durch Inkubation und Wachstum von 10^3 Hela- oder PyY-Zellen überprüft.

Nach 6 Tagen wurde der Toxizitätstest ausgewertet. Das Medium wurde dekantiert, die angewachsenen Zellen mit Hank's Lösung gewaschen, 5 Minuten mit Methanol fixiert, mit Wasser gespült und 10 Minuten mit 0,5 %iger Kristallviolett-Lösung gefärbt. Anschließend wurde der Farbstoff mit Wasser abgespült und die Schalen luftgetrocknet. Die angewachsenen Zellkolonien konnten makroskopisch gezählt werden.

Die im Agar gewachsenen Klone wurden nach 3 Wochen ausgewertet. Die Petrischalen wurden mit einem Stereomikroskop (Fa. Zeiss, Okular mit eingraviertem Maßstab) bei 10-facher Vergrößerung im Dunkelfeld mäanderförmig abgefahren; gezählt wurde alle Klone mit einem Durchmesser ≥ 500 µm.

4. Ergebnisse

4.1 Veränderte Testmethodik

Als Mitte 1977 die von J.A. Styles entwickelte Methodik des Zelltransformationstests (Styles 1977) veröffentlicht und beschlossen wurde, diesen Test in unserem Labor zu etablieren, mußte zunächst die Technik der Zellkultur erlernt werden. Trotz eines vielfältigen Angebots an Fertigmedien und Experimentierhilfen für die Zellzüchtung wurde bald deutlich, wie wichtig die persönlichen experimentellen Erfahrungen des Untersuchers mit dieser Technik sind. Die Verhältnisse von Nährstoffen, Serum und Wachstumsfaktoren optimal einzustellen erfordert viel Erfahrung, die am besten durch Mitarbeit in einem bewährten Labor erworben wird, zumal die Kenntnis gewisser praktischer Details häufig nur durch persönliche Kontakte zu erlangen ist und nicht aus wissenschaftlichen Publikationen.
Zu den anfänglichen Problemen mit der Zellkultur gesellten sich Schwierigkeiten bei der Durchführung des Transformations-Tests, die dazu führten, daß wir eine experimentell abgewandelte Testmethodik benutzten. Diese Abänderungen dienten der experimentellen Erleichterung oder entsprachen zum Teil Vorschlägen von J.A. Styles zur allgemeinen Verbesserung des Tests. Besonders wichtig und für die Auswertung essentiell war ein gutes Wachstum der Klone im Agar. Es kam darauf an, daß die Agar-Konzentration immer gleich war, die Zellen einzeln lagen und ein ausreichendes Größenwachstum der Klone bis 500 µm in 3 Wochen erfolgte. Die Pipettiervorschrift von Styles, 0,625 ml 5 %-igen kochenden Agars zu 10 ml Zellsuspension zu geben, war nicht exakt genug durchführbar und wurde durch die Agar-DMEM Doppelmedium-Methode ersetzt.

Verklumpung der Zellen während der Schüttelinkubation wurde durch Verwendung von Spinner-Medium ohne Ca^{2+}, Mg^{2+} anstelle von Medium-199 vermieden. Das Absinken der Zellen im Agar wurde durch Erhöhung der Endkonzentration auf 0,33 % und das Anwachsen auf dem Plattenboden durch die Benutzung von Bakterienschalen verhindert. Bakterienschalen sind im Gegensatz zu Petrischalen für die Zellkultur nicht oberflächenbehandelt und erlauben kein Anhaften und Wachstum von BHK 21-Zellen. Ein besseres Größenwachstum wurde durch Einsatz einer geringeren Zellzahl pro Agarplatte und Verwendung von 20 % Serumkonzentration erreicht.

4.2. Reproduktion der Ergebnisse von Styles mit Standard-Karzinogenen

Die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse von Styles unter unseren Bedingungen wurde mit bekannten Karzinogenen überprüft: mit den direkt alkylierenden Stoffen EMS und MMS (Tumorerzeugung im Tierversuch: IARC (1974), dem indirekt wirkenden Alkylantium Cyclophosphamid (IARC 1975), mit Mitomycin C (IARC 1976) und den drei polycyclischen Kohlenwasserstoffen B(a)P, DMA und MC. Das als Lösungsmittel fungierende DMSO wurde ebenfalls getestet.
Abbildung 1 zeigt die mit EMS mit und ohne Zugabe von S-9 mix erhaltenen Ergebnisse in der von Styles eingeführten Darstellungsweise. Im oberen Teil des Rechtecks erkennt man die prozentuale Abnahme der Anzahl überlebender Zellen bei steigender Konzentration der Testsubstanz, darunter die auf 100 % Überlebende umgerechnete Zahl transformierter Zellen. Durch diese Korrektur wird die Transformationskraft unterschiedlicher Stoffe vergleichbar.

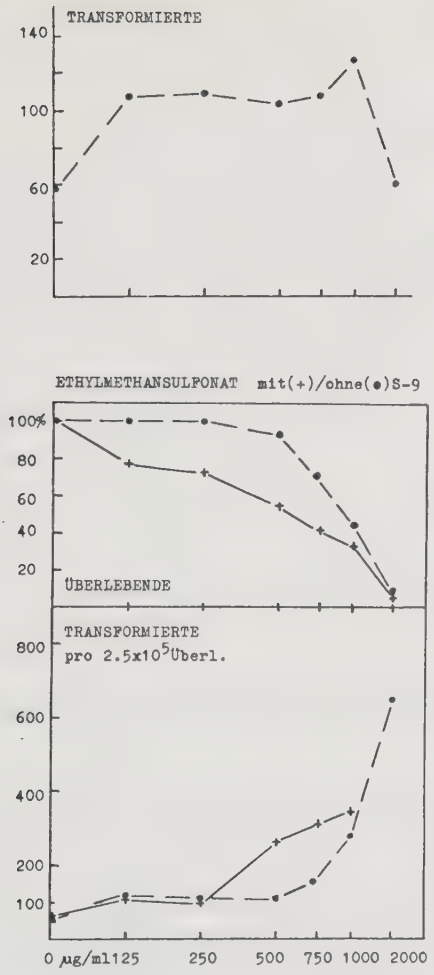


Abb. 1: Ergebnis der Zelltransformation durch EMS, darüber Anzahl transformierter Zellen pro Platte. (Mittelwerte)

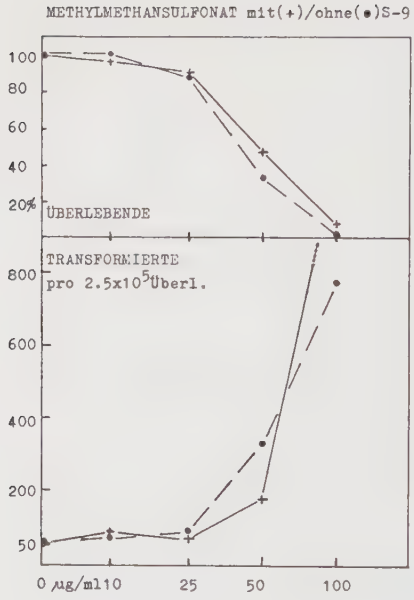


Abb. 2: Ergebnis der Zelltransformation durch MMS.

Die oberste Kurve zeigt zusätzlich die bei verschiedenen Dosierungen gezählte Anzahl transformierter Klone von EMS ohne S-9 mix. Gegenüber der unbehandelten Kontrolle ergaben sich mit Substanz erhöhte Werte, die trotz beginnender Toxizität anstiegen, um oberhalb von 1 mg/ml abzufallen. Die Toxizität von EMS wurde durch Leberhomogenat erhöht.

Auch MMS (Abbildung 2) zeigte einen dosisabhängigen Anstieg transformierter Zellen mit und ohne S-9 mix; MMS wurde hier zum erstenmal getestet.

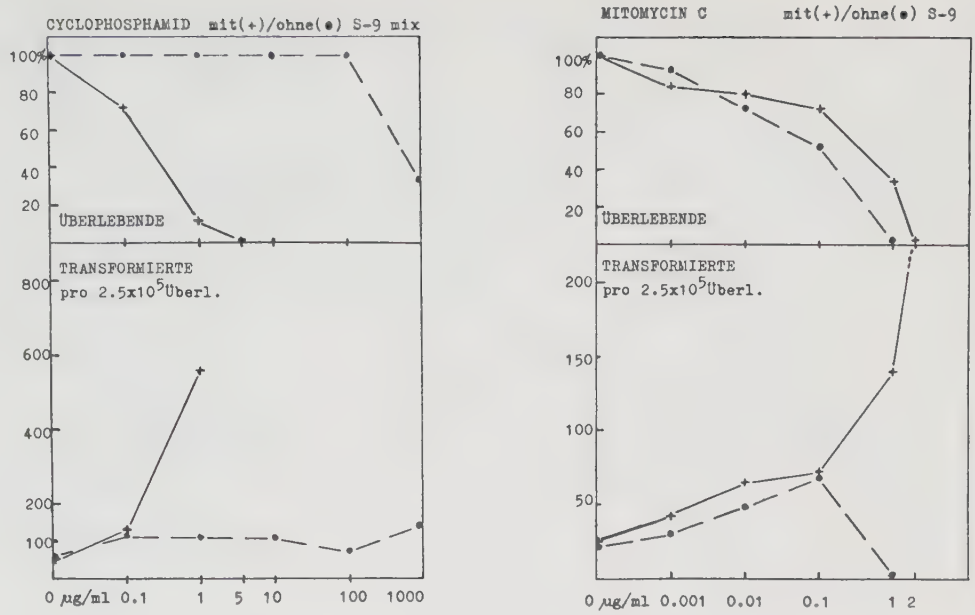
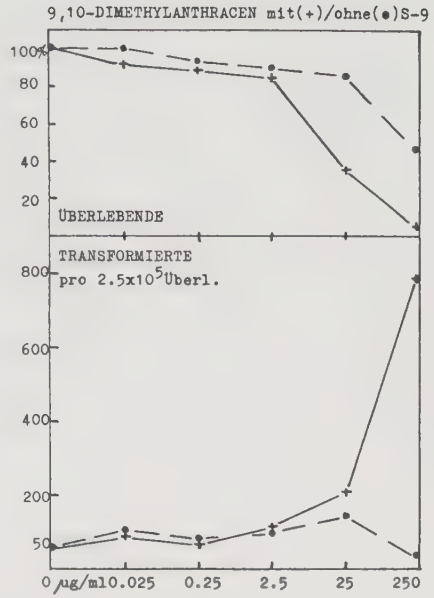
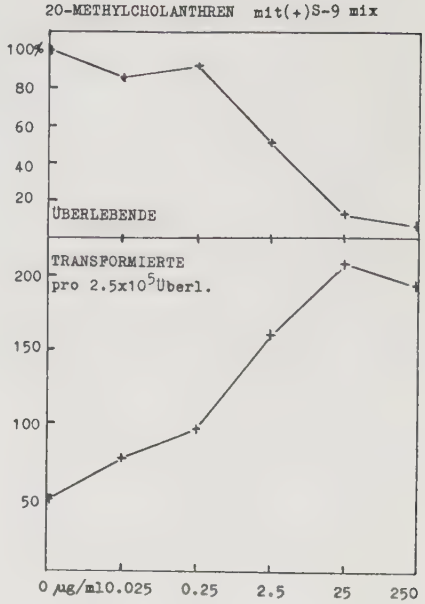


Abb. 3: Ergebnisse der Zelltransformation mit Endoxan^R und Mitomycin C

Bei Endoxan (Abbildung 3) unterschieden sich die Kurven mit und ohne externe Metabolisierung deutlich. Es ist bekannt, daß diese N-Lost-Verbindung erst nach metabolischer Umwandlung alkylierend wirkt (Brock, Hohorst 1963). Toxizität und Transformationsrate stiegen mit S-9 mix bereits bei ein tausendstel der Dosis, die ohne Leberhomogenat nötig war. Daß ohne S-9 mix bei hohen Dosen trotzdem eine Wirkung einsetzte, deutete auf eine zelleigene Enzymaktivität zur Umwandlung von Endoxan hin. Der Carbamidsäureester Mitomycin C, ein besonders gegen Dickdarm- und Magenkarzinome wirkendes Antibiotikum, transformierte BHK-Zellen dosisabhängig (Abb. 3). Mit Benz(a)pyren ergab sich bei 3stündiger Inkubationszeit mit S-9 mix in dem durch die schlechte Löslichkeit vorgegebenen Bereich weder eine erkennbare Toxizität noch eine veränderte Transformationsrate. Mit einer Inkubationsdauer von 6 Stunden erzeugte DMA einen Anstieg der Transformation (Abbildung 4). Wegen der für einen normalen Arbeitstag ungünstigen Länge wurde speziell für die PCK die Inkubationszeit auf 18 Stunden verlängert, d. h. die Zellen wurden über Nacht inkubiert. 20-Methylcholanthren bewirkte unter diesen Bedingungen einen dosisabhängigen Anstieg transformierter Zellen (Abbildung 4). Auch hier ist zur Verdeutlichung des Effekts zusätzlich die Anzahl der im Agar ausgewachsenen Klone aufgezeichnet. Erst im letzten Teil der Kurve macht sich der toxische Einfluß der Substanz bemerkbar. Zum Vergleich der Transformationsaktivitäten verschiedener Stoffe wurde von Styles die korrigierte Anzahl transformierter Klone bei LC_{50} der Substanz benutzt. Ein Anstieg über die 5-fache Nullrate wurde als positives Testergebnis gewertet. Aus theoretischen Untersuchungen über mutagene Effekte von Strahlen und Chemikalien an Hefen ist bekannt, daß die Lage des Maximums der Transformationskurve z. B.

Abb. 4: Ergebnisse der Zelltransformation mit DMA und MC, zusätzlich Darstellung der Anzahl transformierter Zellen pro Platte bei MC.





abhängt von der Form der Toxizitätskurve (Strauss 1971). Bei linearem Verlauf liegt das Maximum dann bei $LC_{62,5}$. Aus diesem Grunde wurden in Tabelle 3 die Faktoren der Erhöhung transformierter Klonzahlen über die jeweiligen Kontrollwerte bei LC_{50} und $LC_{62,5}$ angegeben. Die mittlere Zahl spontan transformierter Zellen (Klone $\geq$ 500 µm) aus 20 Experimenten mit S-9 mix lag bei 40 ± 16 pro Platte. Man erkennt, daß die Faktoren der getesteten Standard-Karzinogene mit S-9 mix deutlich über 2 lagen, jedoch nicht den von Styles geforderten Faktor 5 bei LC_{50} erreichten. Die Faktoren bei $LC_{62,5}$ lagen meist höher als bei LC_{50}. Wahrscheinlich durch den unterschiedlichen Auswertungsmodus war die Anzahl der von uns ausgezählten Klone, speziell im Bereich höherer Substanzkonzentrationen, geringer als die von Styles, so daß kleinere Faktoren resultierten.

Tab.: 3 Erhöhung der Zahl transformierter Klone gegenüber der jeweiligen Spontanrate mit (+) / ohne (•) S-9 mix

		LC_{50} µg/ml	Faktor bei LC_{50}	Faktor bei $LC_{62,5}$
EMS 3hrs.	+	600	4,3	5,0
	•	900	4,6	6,3
MMS	+	47	4,1	4,2
	•	40	2,7	4,2
Endoxan	+	0,22	4,7	8,3
	•	60	2,0	2,3
Mitomycin C	+	0,4	4,3	5,3
	•	0,1	3,6	2,4
DMA 6hrs.	+	12	3,0	3,4
	•	200	1,4	-
MC 18hrs.	+	2,5	3,3	3,7

Zur Absicherung, daß das als Lösungsmittel verwendete DMSO nicht selbst transformierte, wurde es zusammen mit S-9 mix 18 Stunden inkubiert. Neben den stets mitlaufenden 10 µl DMSO enthaltenden Kontrollansätzen zeigt Abbildung 5, daß DMSO auch in höheren toxischen Mengen keine transformierenden Eigenschaften besaß. Damit waren die Inkubationsbedingungen gefunden, unter denen PCK, denen unser spezielles Interesse galt, getestet werden konnten.

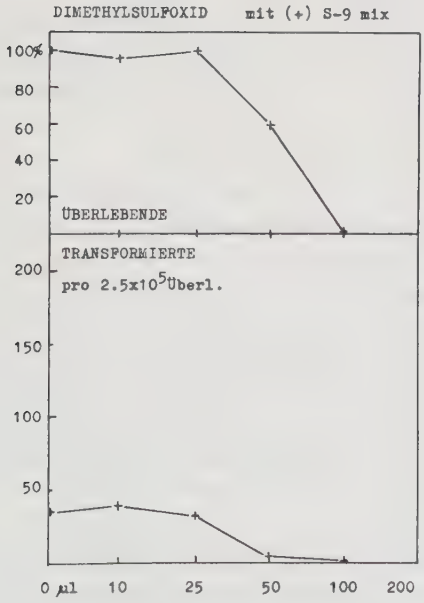


Abb. 5: Ergebnis des Zelltransformations-Tests mit DMSO.

4.3 Prüfung verschiedener polycyklischer Kohlenwasserstoffe

Die Ergebnisse der acht untersuchten Stoffe sind in den Abbildungen 6-9 graphisch dargestellt. Einzelwerte finden sich in Tabellen am Ende der Arbeit.
Benz(a)pyren zeigte nach 18stündiger Inkubation ohne S-9 mix keine Zunahme transformierter Zellen, mit Leberhomogenat einen deutlichen Anstieg. Da bekannt ist, daß PCK erst durch die in den verschiedenen Organismen vorhanden mischfunktionellen Oxygenasen in reaktive Zwischenprodukte ("ultimate carcinogens") umgewandelt werden müssen, wurden die folgenden Substanzen nur mit S-9 mix getestet. Benz(e)pyren war schwächer wirksam als B(a)P. Chrysen und Benzanthracen bewirkten einen dosisabhängigen Anstieg der Transformation. Phenanthren erhöhte unter Berücksichtigung der Streubreite der Einzelwerte das Niveau der spontanen Transformationsrate nicht.
Aus der Umrechnung von Transformationswerten, die streng der Toxizitätskurve folgten, resultiert eine gerade Linie auf dem Niveau der Kontrolle.
Die Kurven von Dibenzanthracen und Benz(b)fluoranthen stiegen nur langsam an, leider wurde infolge der schweren Löslichkeit von DBA nicht der gesamte toxische Bereich erfaßt. Für Anthracen bewegte sich die Transformationsrate über den gesamten Toxizitätsbereich in Nähe des Kontrollwertes. Gemäß der Korrekturrechnung resultiert das aus einem Abfall der Zahl transformierter Klone vom Kontrollwert an.
Zur Veranschaulichung sind in Abbildung 10 die prozentualen Überlebensraten und Transformationsausbeuten (Kontrolle=100%) von AC, DBA und B(b)F dargestellt. Man erkennt den parallelen Verlauf beider Kurven bei AC und den deutlichen Anstieg der transformierten Klonzahl mit beginnender Toxizität bei den schwach transformierenden Substanzen DBA und B(b)F. Außer AC und PA zeigten alle PCK eine Dosis-Wirkungs-Beziehung.

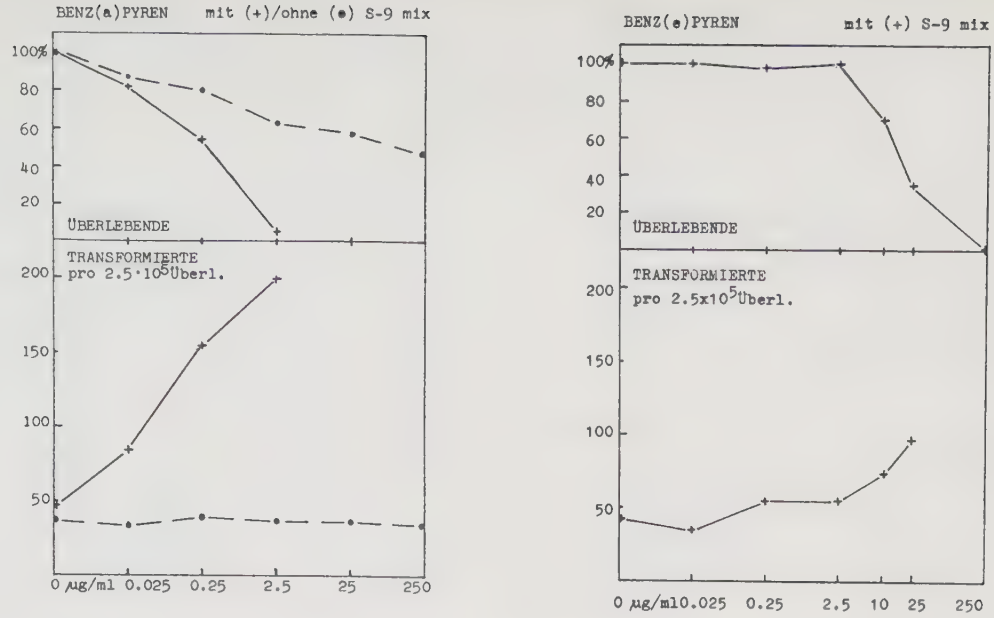


Abb. 6: Ergebnisse der Zelltransformation mit B(a)P und B(e)P.

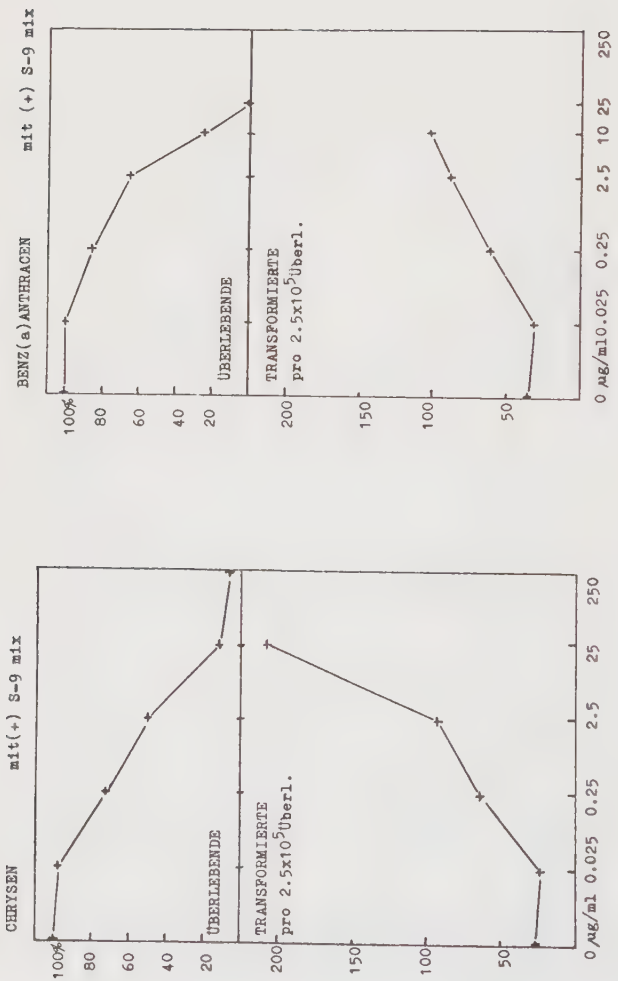


Abb. 7: Ergebnisse der Zelltransformation mit CH und BA.

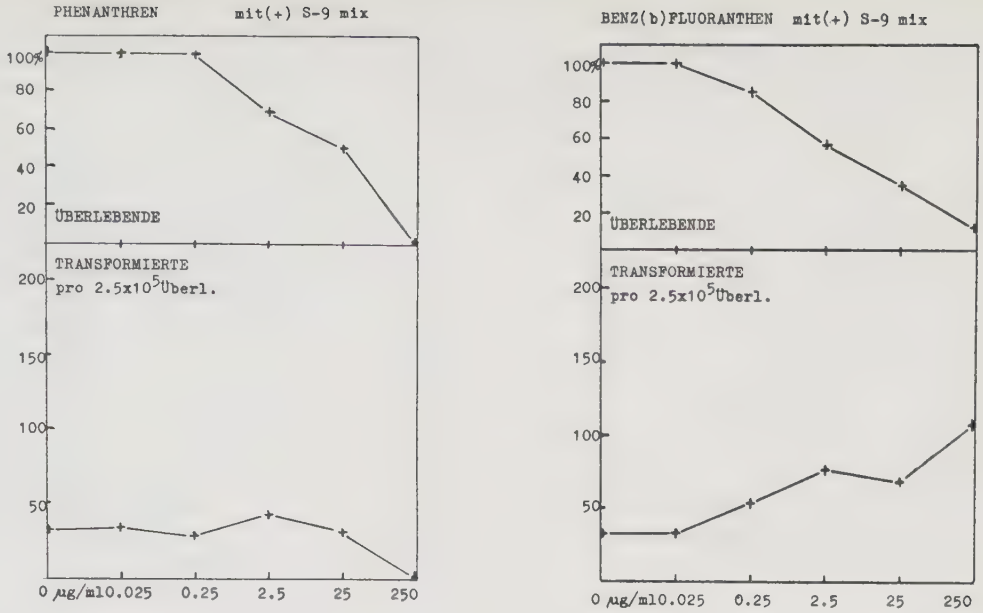


Abb. 8: Ergebnisse des Zelltransformations-Tests mit PA und B(b)F.

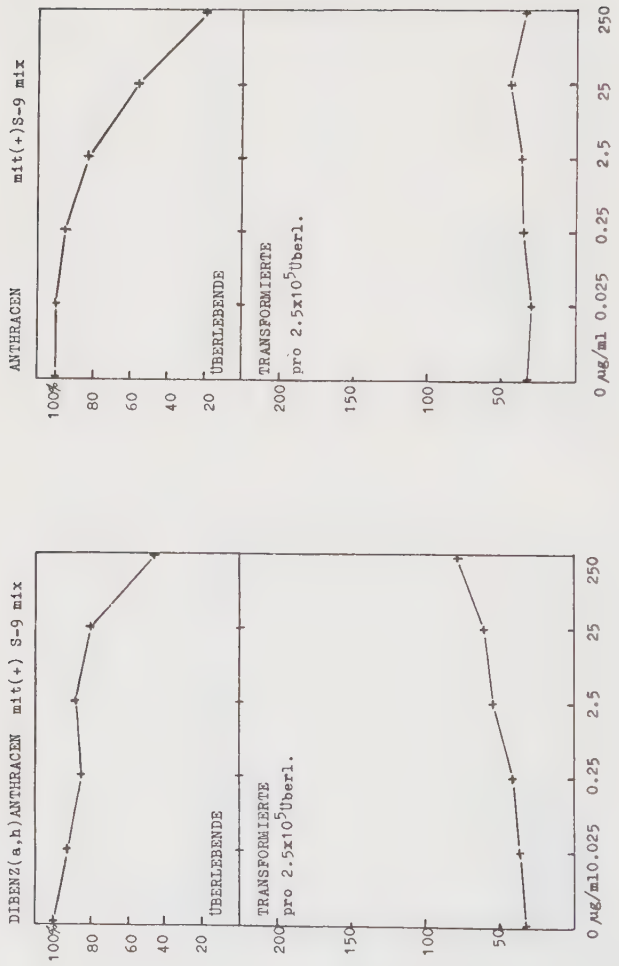
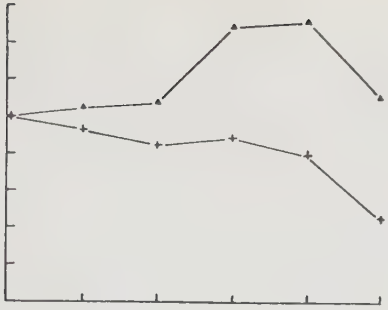
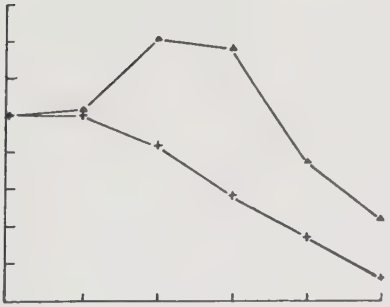


Abb. 9: Ergebnisse des Zelltransformations-Tests mit DBA und AC.

DBA



B(b)F



AC

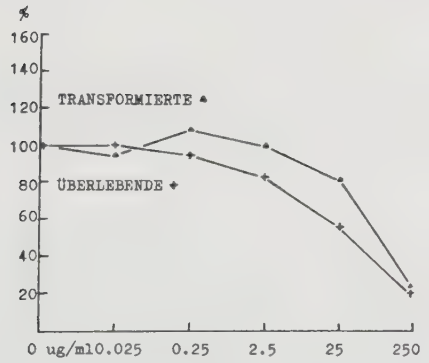


Abb. 10: Ausbeuten transformierter und überlebender Zellen in % bezogen auf Kontrolle (100%).

In Tabelle 4 sind die Transformationsraten als Vielfaches der jeweiligen Kontrollen bei LC_{50} und $LC_{62,5}$ in abnehmender Reihenfolge aufgeführt.

Substanz	Anzahl spontan transform.Klone	Anzahl transf. Klone bei LC_{50}	Faktor bei LC_{50}	Faktor bei $LC_{62,5}$
B(a)P	45,5	165	3,6	3,8
CH	27	90	3,3	5,2
BA	36	92	2,5	2,7
B(b)F	32	75	2,3	2,2
DBA	32	75	2,3	-
B(e)P	42	85	2,0	2,2
AC	32	45	1,4	1,2
PA	32	30	0,9	0,8
B(a)P •	38	35	0,9	-

Tab.: 4 Erhöhung der Zahl transformierter Klone gegenüber der jeweiligen Spontanrate. Außer • alle Werte nach 18 hrs. Inkubation mit S-9 mix.

Von den genannten Stoffen wurden von Styles B(a)P und BA mit positivem (Faktor 5) und AC mit negativem Ergebnis (Faktor 1) getestet. Zusätzlich zur Verwendung einer möglichst gleichwertigen Qualität des S-9 mix wurde der wirkungsbestimmende Effekt dieser Komponente durch Angabe der Resultate bei äquitoxischer Dosis z.B. LC_{50} als standardisiertem biologischem Endpunkt relati-

viert. Zum Vergleich der Transformationspotenz verschiedener Stoffe in unserem System wurden bei LC_{50} die prozentualen Transformationsraten pro nmol ausgerechnet (Tabelle 5). Unter gleichen Bedingungen getestete Substanzen wurden in der Reihenfolge abnehmender Potenz geordnet. B(a)P war von den PCK der am stärksten transformierende Stoff, gefolgt von MC und CH. Verbindungen mit fehlender eindeutiger Dosis-Wirkungs-Beziehung wurden nicht aufgeführt. Auf Molarität bezogen, zeigte Mitomycin C die stärkste Wirkung von allen Substanzen, danach kam Endoxan. Die Alkylantien MMS und EMS waren wenig aktiv.

Tabelle 5.: Relative Transformationskraft der Prüfsubstanzen in unserem Testsystem bei unterschiedlichen Inkubationszeiten von 18, 6 und 3 Stunden, mit (+) / ohne (•) S-9 mix

Substanz		LC_{50} µg/ml	MG	LC_{50} nmol/ml	Erhöhung d. spontanen Transformationsrate in % bei LC_{50}	rel.Transformationsrate (%) pro nmol
B(a)P		0,32	252	1,3	360	277
MC		2,5	268	9	330	37
CH		2,5	228	11	330	30
BA		4	228	18	250	13,9
B(b)F		5	252	20	230	11,5
B(e)P		16	252	63	200	3,1
DBA		200	278	720	230	0,3
DMA		12	206	58	300	5,2
Mitomycin	+	0,4	334	1,2	430	358
	•	0,1		0,3	360	1200
Endoxan	+	0,22	261	0,8	470	587
MMS	+	47	110	427	410	0,9
	•	40		364	270	0,7
EMS	+	600	124	4838	430	0,09
	•	900		7258	460	0,06

5. Diskussion

5.1 Bewertung der Ergebnisse und Vergleich mit Resultaten aus anderen Transformationstests.

Zunächst soll ausführlich dargelegt werden, warum es nicht gelang, die von Styles angegebenen Zahlen chemisch transformierter Klone zu erreichen. Der Unterschied lag nicht in einer mangelnden Klonbildung begründet, sondern war vermutlich auf den anderen Auswertungsmodus zurückzuführen. Trotz minutiöser Schilderung des Experiments wurde in der die Methodik beschreibenden Veröffentlichung (Styles 1977) der Auswertungsmodus ungenau dargestellt, die Benutzung eines automatischen Kolonie-Zählgerätes nicht erwähnt. Gemäß der Vorschrift haben wir, um Styles' Werte zu reproduzieren, nur Klone von $\geq$ 500 µm Größe im Agar gezählt. Die Klongröße wurde jedoch entscheidend beeinflußt von der Anzahl ausplattierter Zellen (weniger Zellen haben relativ mehr Nährstoffe zur Verfügung), vom Zeitpunkt der Zählung (in der dritten Woche wuchsen die Klone weniger dicht besiedelter Platten schneller) und von dem Umstand, ob mit den Zellen unlösliche und deshalb nicht durch Waschen und Zentrifugieren entfernbare Substanz in den Agar gelangte. Diese wirkte dann auch im Agar noch toxisch, so daß in Platten mit hohen Konzentrationen von PCK die mittlere Klongröße deutlich unter der niedriger Konzentrationen lag. Die von uns nicht gezählten kleineren Klone wurden von Styles offenbar mit ausgewertet. An dem von ihm zur Auswertung benutzten automatischen Kolonie-Zählgerät läßt sich die zu registrierende Klongröße z.B. durch die Lage der Zellhaufen in verschiedenen Ebenen der Agarschicht nicht so genau einstellen. Klone $\leq$ 100 µm wurden von Styles als "small aborted colonies" nicht mitgezählt. Der Bereich zwischen 100 und 500 µm wurde wohl automatisch

mitberücksichtigt und es resultierten in toxischen Bereichen höhere Zahlen transformierter Klone als von uns visuell erfaßt wurden. Das von Styles gewählte Kriterium einer mindestens fünf-fachen Erhöhung der spontanen Transformationsrate bei LC_{50} für den Nachweis der transformierenden (positiven) Wirkung einer Substanz resultierte aus dem Versuch, zwischen den 120 im CTT getesteten bekannten karzinogenen und nicht karzinogenen Stoffen (Purchase et al., 1978) das für optimale Übereinstimmung mit den Tierexperimenten günstigste Unterscheidungsmerkmal herauszufinden. Dieses für hohe Sensitivität und Spezifität willkürlich festgesetzte Maß konnte infolge des visuellen Auswertungsmodus auf unsere Ergebnisse nicht angewendet werden.

Für die von Styles schon früher unter ähnlichen Bedingungen untersuchten und für positiv befundenen Substanzen EMS, Endoxan und DMA ergab sich in unseren Versuchen eine deutliche Dosis-Wirkung-Beziehung. Die mit einem nach Abschluß der experimentellen Arbeiten angeschafften automatischen Kolonie-Zählgerät gewonnenen Erfahrungen ergaben, daß sich die so erhaltenen Zahlen zwar von den mit dem Auge ausgezählten unterschieden, eine Dosis-Wirkungs-Beziehung aber in beiden Fällen erkennbar war. Es wurde deshalb als Beweis für transformierende Wirkung in den eigenen Experimenten das Vorhandensein einer Dosis-Wirkungs-Beziehung angesehen mit der zusätzlichen Maßgabe, daß bei LC_{50} der Substanz die Transformationsrate mindestens das Doppelte der spontanen Transformationsrate betragen sollte. Diese Sicherheitsgrenze resultiert daher, daß bei einem Generationszyklus von ca. einem halben Tag für die BHK-Zellen und 18stündiger Inkubation durch die Substanzbehandlung eine selektive Vermehrung spontan transformierter Zellen möglich gewesen wäre, die nach Berechnung der Transformationsrate (Transformierte pro Überlebende) z.B. bei LC_{50} als

Verdopplung hätte erscheinen können. Durch Zellzählung vor und nach 18stündiger Inkubation in Suspensionskultur mit dem Mangelmedium MEM-Spinner konnte eine allgemeine Zellvermehrung nicht erkannt werden, außerdem kam es nicht zu einem generellen Anstieg transformierter Zellen bei nichttoxischen Konzentrationen. Eine theoretisch mögliche Selektion durch selektive Toxizität der Substanzen speziell gegenüber normalen, nicht transformierten BHK-Zellen, die ebenfalls zu einer artefiziellen Erhöhung der Transformationsrate hätte führen können, fand nicht statt, was aus den abnehmenden Transformationswerten bei steigender Dosis der Substanzen PA, DMSO und B(a)P ohne S-9 mix hervorgeht. Werte, die bei LC_{50} über der zweifachen Transformationsrate lagen, waren also sicher durch die Substanz induziert. Demnach zeigten B(a)P, CH, MC, DBA, BA, B(b)F und DMA mit S-9 mix transformierende Wirkung; PA, AC, DMSO sowie B(a)P ohne S-9 mix blieben ohne Effekt. B(e)P bewirkte trotz vorhandener Dosis-Wirkungs-Beziehung nur eine Verdoppelung der spontanen Transformationsrate, war also nicht sicher transformierend.

Für den Erhalt einer Dosis-Wirkungs-Beziehung war es wichtig, daß die transformierende Wirkung über den gesamten Toxizitätsbereich der Testsubstanz verfolgt wurde. Die Zytotoxizität konnte als Hinweis auf das Eindringen der Substanz in die Zellen gewertet werden. Eine Erhöhung der Transformation begann immer erst bei toxisch wirkenden Konzentrationen, allerdings stieg die Zahl transformierter Zellen noch an, wenn die Anzahl der überlebenden Zellen schon sank. Stark toxisch wirkende Stoffe zeigten jedoch nicht unbedingt eine hohe Transformationskraft und umgekehrt. Di Paolo bewies 1971 an BHK-Zellen, daß Toxizität und Transformation zwei unabhängige Ereignisse waren. In Abbildung 11 ist die Erhöhung der Transformationsrate gegenüber den Kontrollen gegen die Toxizität als LC_{50} dargestellt. Man erkennt stark

transformierende Verbindungen mit geringer und hoher Toxizität (Beispiele: EMS bzw. Endoxan). Mitomycin C zeigte mit S-9 mix eine erhöhte Transformationsrate bei verminderter Zytotoxizität. Dieser Stoff, von Purchase et al. (1978) als negativ eingestuft, zeigte nach meinen Kriterien einen deutlichen Effekt und hohe Zelltoxizität. Auch in vivo reicht für Mitomycin C etwa ein hundertstel der Dosis von EMS oder B(a)P bei gleicher Versuchsart zur Erzeugung von Tumoren im Tier aus. Behandlung der Zellen mit MMS ergab bei gleicher Zelltoxizität mit S-9 mix eine größere Transformationsrate. Zusätzlich zu den von Styles und Purchase et al. (1978) früher untersuchten Stoffen (8) wurden sieben neue Verbindungen getestet.

PCK wurden auch in anderen Zellkultursystemen auf transformierende Wirkung untersucht: z.B. in Versuchen mit Hamster-Embryo Fibroblasten (Bergwald, Sachs 1965; Di Paolo 1971 und Pienta 1979), mit Mäuse-Fibroblasten (Kakunaga 1973) und mit Zellen von Ratten-Embryonen (Freeman, Weisburger 1973). Übersichten finden sich bei Heidelberger (1975) und Parodi (1977). Von Mishra et al. (1978) wurden mit Rauscher-Leukämie-Virus infizierte Rattenzellen eingesetzt. Mit der Soft-Agar-Technik erwiesen sich AC, PA und B(e)P als nicht transformierend. Außer diesen bewirkten alle anderen Stoffe auch in den oben angeführten, vorwiegend auf morphologische Kriterien ausgelegten Tests eine Zelltransformation.

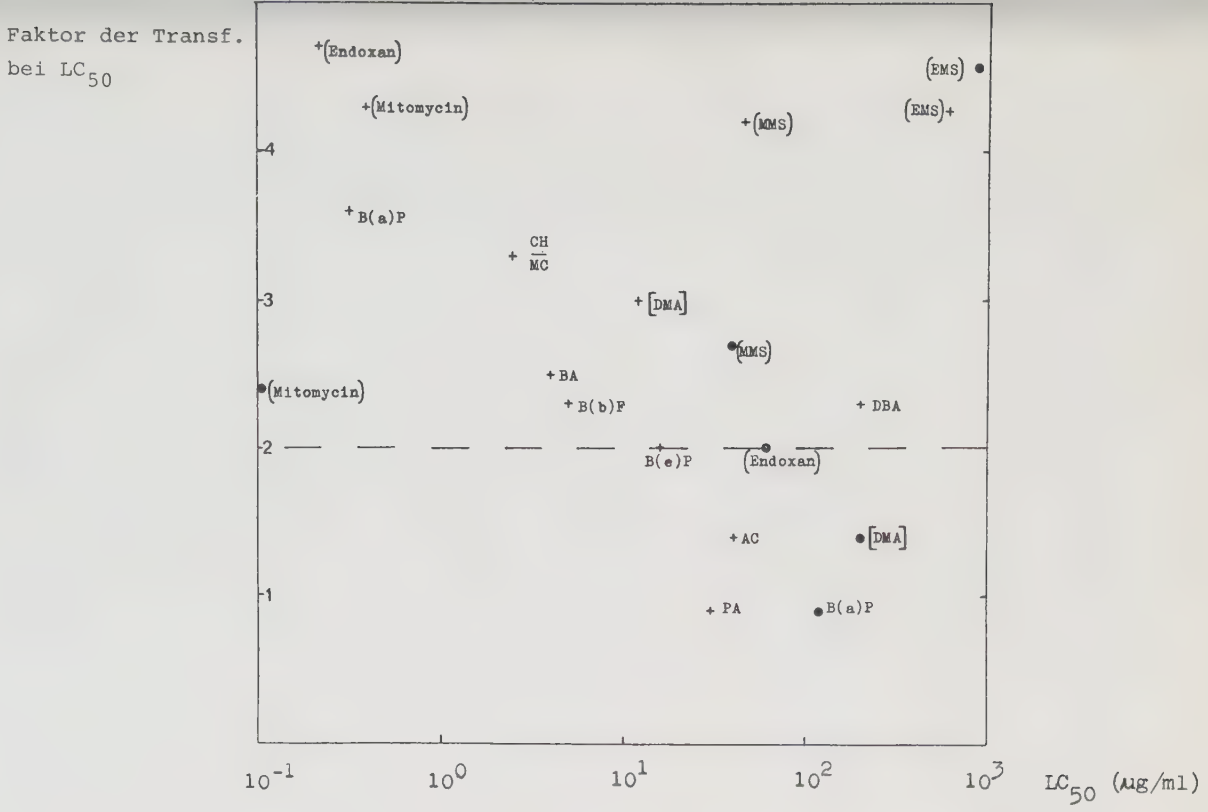


Abb. 11: Vergleich von Transformationskraft und Toxizität
Inkubationszeit (3h), [6] .

Die Schwierigkeit der Reproduktion und routinemäßiger Durchführung von Transformationsversuchen zeigt sich allgemein daran, daß viele Forscher nur mit einer Zellart und in einem in langer Erfahrung ausgeklügelten System arbeiten. Häufig wurden die Zellen in diesen Arbeitskreisen erstmalig kultiviert mit der Folge, daß jeder Forscher sein eigenes System besitzt. Diese Problematik umging Styles, indem er die käufliche und leicht kultivierbare, permanente Zellinie BHK 21/Cl 13 einsetzte. Dem Vorteil einer relativ stabilen Zellinie steht aber als Nachteil die Existenz spontan transformierter Zellen gegenüber, deren Zahl bei länger dauernder Kultur ansteigt. Karzinogene Stoffe bewirken dann nur eine Erhöhung der spontanen Transformationsrate. Bei Verwendung von primären Hamsterzellen (Pienta 1979) tritt eine Transformation erst nach Substanzbehandlung auf, doch induzieren auch starke Karzinogene nur eine geringe Zahl transformierter Zellen, so daß schwach wirksame Substanzen leicht übersehen werden können (Umezawa et al. 1978). Außerdem bereitet die Herstellung sich gleich verhaltender primärer oder sekundärer Zellen erhebliche Schwierigkeiten. Pienta wertete die innerhalb von acht Tagen in Petrischalen mit Testsubstanz gewachsenen Kolonien morphologisch aus. Bei schnellerem Testergebnis war der Aufwand für die Zellkultur erheblich größer, so mußten bestimmte Zellchargen auf Transformierbarkeit vorgetestet werden.
In einer dritten Testvariante (Umeda und Iype 1973) läßt man die Zellen nach kurzer Behandlung mit der Testsubstanz mehrere Tage in normaler Kultur wachsen und ihre Eigenschaften exprimieren, bevor sie in Soft-Agar gelangen. Hierbei ist sehr wichtig, daß man die Anzahl der Generationen genau kennt, da die auf fester Oberfläche kumulierenden Zellen Mikrokolonien bilden, die nach dem Trypsinieren als Einzelzellen in den Agar kommen. In einer

großen Population kann die Generationszahl jedoch stark variieren und man weiß nicht, ob die langsam oder schnell wachsenden Zellen im Agar Kolonien bilden. Es ist daher sinnvoll, die Zellen sofort nach Behandlung in den Agar zu geben. Ishii et al. (1977) behandelten BHK-Zellen auf fester Unterlage. Vergleicht man diese verschiedenen Techniken miteinander, so erscheint uns der Tranformationstest nach Styles unter Berücksichtigung der Aussagekraft des Weichagarkriteriums als relativ einfache und mit geringem Kulturaufwand verbundene Methode. Ihre Schwächen liegen in der Existenz spontan transformierter Zellen und in der Auswertung.

5.2. PCK-Resultate in anderen Test-Systemen

Die Gruppe der polycyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe wurde sehr intensiv in vivo auf ihre karzinogene Wirkung getestet. Eine Zusammenstellung der Tierversuche mit B(a)P, B(e)P, BA, B(b)F, DBA und CH findet sich in der IARC Monographie (1973); MC und DMA erwiesen sich ebenfalls als karzinogen (Shellabager 1972, Kennaway et al. 1942, Lijinsky u. Saffiotti 1965). Nach der "Bay-Region-Theorie", einer Hypothese zur Struktur-Wirkungs-Beziehung von PCK, ist für die krebsauslösende Wirkung ein anellierter Benzolring essentiell, an dem nach Hydroxylierung und Epoxidierung ein Carboniumion entstehen kann, welches mit nucleophilen Zentren von DNS-Basen reagiert (Lehr und Jerina 1978). Für B(a)P wurden z.B. DNS-Addukte des stark karcinogenen BP-7, 8-diol-9, 10-Epoxid an die exoständige Aminogruppe des Guanins nachgewiesen (Wood et al. 1976). Die Kanzerogenität hängt danach auch von den weiteren am annelierten Ringsystem vorhandenen Substituenten und ihrem die Oxidierung der bay-region begünstigenden Effekt ab (Tsang und Griffin 1979). In Abbildung 12 sind die Strukturformeln der von uns untersuchten PCK mit Hinweis auf die bay-region dargestellt.

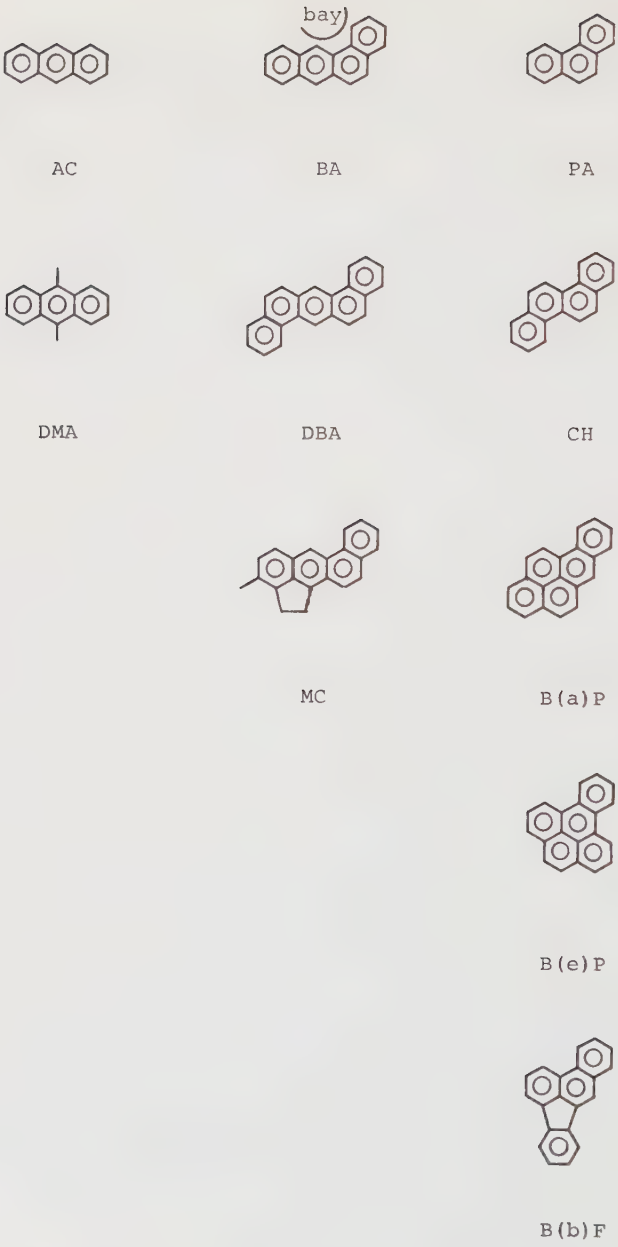


Abb. 12: Strukturformeln der untersuchten PCK mit Hinweis auf "bay-region".

Man erkennt die enge strukturelle Verwandtschaft der getesteten Verbindungen: die Isomeren AC und PA, BA und CK, B(a)P, B(e)P und DBA. MC ist ein Derivat von BA und B(b)F ein Abkömmling von PA. Außer AC und DMA enthalten alle Moleküle die sog. bay-region und sollten tumorauslösend sein. Phenanthen kann ein Bay-Region-Epoxiddiol bilden, erweist sich im klassischen Tierversuch jedoch als negativ (Schäfer-Ridder 1979). Anthracen -ohne bay-region- wird allgemein als inaktiv angesehen, erzeugte aber in Versuchstieren nach besonders langer Lebens- und Latenzzeit Tumore (Schmähl 1955, Druckrey und Schmähl 1955). In einer anderen Versuchsart, der "initiation promotion procedure", wurden Mäuse nach einmaliger Behandlung mit PCK wochenlang mit dem Tumorpromotor TPA gepinselt (Scribner 1973). Unter diesen Bedingungen erzeugten auch Anthracen und Phenanthren Neoplasien. B(e)P war stärker tumorauslösend, bewies aber in vivo ohne TPA-Behandlung eine schwache Aktivität (Wynder und Hoffmann 1959). Trotz vorhandener Bay-Region wird B(e)P von vielen Autoren als nicht karcinogen eingestuft (Hartwell 1951). Rogan et al. (1978) wiesen auf andere, der bay-region Theorie widersprechende Befunde hin. Es wird jedoch allgemein akzeptiert, daß die biologische Aktivität der PCK weitgehend von ihrer Umwandlung in reaktive Zwischenstufen abhängt (Osborne 1979). Daraus folgt, daß Effekte im Tierversuch von Applikationsform und vorhandener Enzymaktivität abhängen und im in vitro Experiment das Vorhandensein eines metabolisierenden Systems erforderlich ist. Da die erwähnten Kanzerogenitätstest-Daten nicht unter gleichen Bedingungen gefunden wurden, soll auf eine Rangfolge der Testsubstanzen bezüglich der Tumoraktivität im Tier verzichtet werden.

Wegen der häufig gleichzeitig vorhandenen mutagenen und karzinogenen Wirkung vieler Substanzen und der daraus resultierenden Möglichkeit, Karcinogene in Mutationstests zu erkennen, sollten deren Ergebnisse hier berücksichtigt werden.
Alle PCK-Testsubstanzen wurden im Ames-Test untersucht: B(a)P, B(e)P, MC; DBA, CH, BA, AC, PA (Mc Cann et al. 1975), B(a)P, B(e)P, DBA, MC, DMA (Andrewes et al. 1978), B(a)P, BA, AC, DMA, MC (Purchase et al. 1978) und B(b)F (Strobel priv. Mitteilg. 1979). Unter Zusatz von Leberhomogenat erzeugten die meisten Substanzen Rückmutationen, B(e)P wirkte schwach mutagen und Anthracen und Phenanthren wurden als negativ bewertet. B(a)P, MC, BA und DBA zeigten an V 79 Hamster-Zellen die Fähigkeit, Vorwärtsmutationen auszulösen (Krahn und Heidelberger 1977). Die Verwendung von "feeder cells" anstelle von S-9 mix führte zu ähnlichen Ergebnissen (Hubermann und Sachs 1974 und 1976). Weitere Untersuchungen von PCK bezüglich der Punktmutationen an verschiedenen loci unterschiedlicher tierischer und menschlicher Zellen wurden von Holsteiner und Mc Cann (1979) zusammengefaßt. Eine Induktion von Schwester-Chromatid-Austausch, ein gegenüber zytogenetischen Tests empfindlicheres Verfahren wurde von allen PCK außer von Anthracen bewirkt (Roszinsky-Köcher et al. 1979). In vivo wurden Chromosomenschäden in Verbindung mit PCK in verschiedenen Testsystemen gefunden: B(a)P und BA schädigten Chromosomen im Knochenmark des chinesischen Hamsters, CH zeigte mutagene Wirkung an Oocyten der Maus, AC und PA waren negativ (Basler und Röhrborn 1978).

5.3 Interpretation und Bedeutung des Zelltransformationstests

Die Aufgabe eines Screening-Tests besteht darin, zwischen verdächtigen und unverdächtigen Substanzen zu unterscheiden. Es ist allgemein üblich, als Testresultat die Stoffe mit "positiv" oder "negativ" zu kennzeichnen, was leicht ein endgültiges Urteil suggeriert. Besonders die Bezeichnung "Ames-positiv" mit der für die Biologie vielleicht zu eindeutigen Aussage "carcinogens are mutagens" (Ames 1973) im Hintergrund wird von Laien oft als "diese Substanz ist karzinogen" mißinterpretiert. Zur Feststellung eines sicher nachgewiesenen Effekts bedarf es zwar eines Kriteriums, wie z.B. der zweifachen Nullrate, doch variiert diese Grenze häufig von Untersucher zu Untersucher. Je nach Stärke der Wirkung findet man neben eindeutig positiven auch wegen des Kriteriums nicht ausreichend positive Stoffe. In Anbetracht der großen Entfernung der im Sreening gemessenen Effekte vom Nachweis der Krebsauslösung im Menschen, erscheint die Unterscheidung zwischen positiv und nicht ausreichend positiv = negativ willkürlich und wenig sinnvoll. Wichtig ist die Benennung negativer Stoffe, denn alle nicht negativen = verdächtigen Substanzen bedürfen ohnehin einer weitergehenden Untersuchung, der Klärung, ob es sich um wirklich tumorauslösende oder nur um falsch-positive Stoffe handelt. Aus diesen aufwendigeren und mit größerer Relevanz verbundenen Tests resultieren sowieso Ergebnisse, die aufgrund ihrer Aussagekraft die Resultate aus Screening-Tests vergessen lassen: nach einem Beweis der Kanzerogenität im Tierversuch ist das Ergebnis der transformierenden Wirkung in vitro für die Charakterisierung der Substanz nebensächlich. Die Aussage eines mit ausreichend hoher Dosierung (wegen der geringen Testpopulation) durchgeführten Zwei-Jahres-Tierversuchs lautet bei

positivem Ausgang: eine karzinogene Wirkung am Menschen ist möglich, kann aber unter Praxisbedingungen unterbleiben. Zeigt eine hohe Dosis keinen Effekt, dann ist eine Kanzerogenität unwahrscheinlich. Analog dieser Auffassung sollte ein Screening-Test, wie der Zelltransformationstest, interpretiert werden. Substanzen, die inklusive Metabolisierung auch über den toxischen Bereich keinen Anstieg der Transformationsrate bewirken, können als negativ angesehen werden. Neben dem früher definierten Nachweis einer "sicher" chemisch induzierten Transformation, bedeutet aber schon das Auftreten einer Dosis-Wirkungs-Beziehung ohne Überschreiten der zweifachen Nullrate einen Verdacht auf Transformation und damit Verdacht auf karzinogene Wirkung in vivo. So wird bei fehlender Statistik eine willkürliche Grenze zwischen positiven und nicht ganz positiven Stoffen vermieden.
Die Verlagerung des Gewichts auf die Aussage des negativen Ergebnisses verhindert nicht nur eine vorschnelle Überinterpretation, sondern erscheint auch angebracht, solange Ätiologie und Art der Zelltransformation ungeklärt sind.

In Abbildung 13 ist diese Interpretation anhand der Ergebnisse mit B(a)P veranschaulicht. Mit S-9 mix konnte B(a)P als verdächtigt eingestuft werden - die Transformation war sogar sicher substanzinduziert - , ohne S-9 mix war es negativ.
Entsprechend erwiesen sich Anthracen, Phenanthren und Dimethylsulfoxid als negativ, und alle anderen PCK, inklusive B(e)P verdächtig auf transformierende Wirkung.
Die Bedeutung des Tests wird durch diese vorsichtige Interpretation nicht geschmälert. Der Zelltransformations-Test stellt eine moderne Kurzzeit-Methode dar, den Langzeiteffekt der Kanzerogenität von Umweltsubstanzen aufzudecken. Als Screening-Methode trennt er unverdächtige und verdächtige Chemikalien mithilfe eines noch unverstandenen

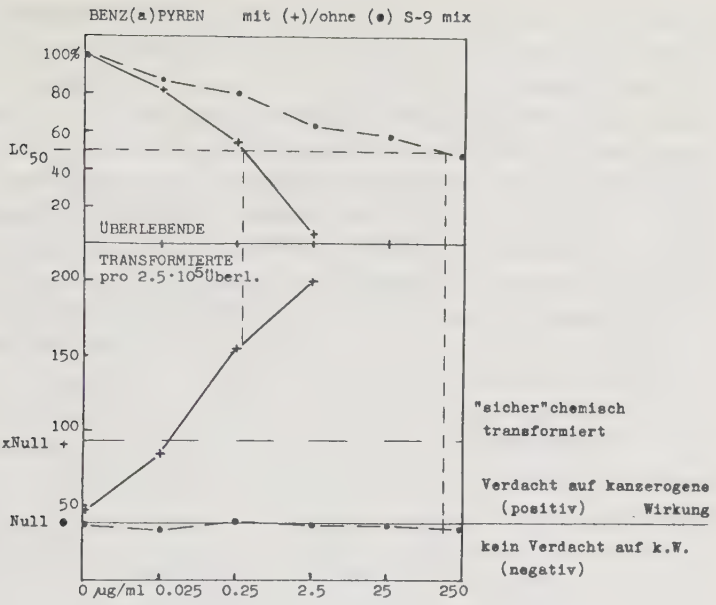


Abb. 13: Kriterien zur Interpretation des Zelltransformations-Tests dargestellt am Beispiel B(a)P: Testergebnis mit S-9 mix positiv, ohne S-9 mix keine Dosis-Wirkungs-Beziehung = negativ.

Effektes mit wahrscheinlich hoher Aussagekraft für die Tumorentstehung in vivo. Im Gegensatz dazu wird im Ames-Test eine Mutation am Bakterium als eindeutiges und bekanntes Ereignis nachgewiesen, dafür ist die Extrapolation auf Krebserzeugung im Versuchstier rein statistisch. In der Praxis wird deshalb eine Kombination mehrerer Screening-Tests die Sicherheit der Auslese verdächtiger Substanzen erhöhen.

Im gleichen Sinne wird die Weiterentwicklung bestehender Methoden betrieben, den Einsatz von Zellkulturen betreffend sind folgende Trends erkennbar: Suche nach neuen auswertbaren Endpunkten der Transformation (Traul et al. 1979), Transformation menschlicher Zellen (Kakunaga 1978), Benutzung von Zellen epithelialer Herkunft, weil Karzinome beim Menschen viel häufiger vorkommen als nicht-epitheliale Tumoren (Fusenig et al. 1978, Montesano et al. 1973) und Kombination von in vivo und in vitro Methoden zur Verkürzung der Versuchsdauer im lebenslangen Tierversuch (Di Paolo et al. 1973, Zbinden und Schlatter 1978, Shabad et al. 1972, Laerum u. Rajewsky 1975).

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Aufbau der Zellkultur wurde der Zelltransformationstest methodisch so verändert, daß unter unseren Bedingungen ein optimales Wachstum der Zellklone im Agar erreicht wurde.
Die getesteten Standard-Karzinogene Ethylmethansulfonat, Methylmethansulfonat, Cyclophosphamid, Mitomycin C, Dimethylanthracen und 20-Methylcholanthren erhöhten die Zahl transformierter Klone im Agar dosisabhängig und überschritten bei der jeweiligen LC_{50} das Doppelte der spontanen Transformationsrate. Das von Styles für einen positiven Testausgang gewählte Kriterium einer fünffachen Erhöhung der Nullrate war aufgrund der unterschiedlichen Testmethodik und des visuellen Auswertungsmodus entstandener Zellklone von 500 µm Größe nicht anwendbar. Cyclophosphamid und die Kohlenwasserstoffe besaßen nur mit Zugabe von Leberhomogenat transformierende Wirkung.
Von den untersuchten polycyclischen Kohlenwasserstoffen erwiesen sich nach 18 h Inkubation mit S-9 mix Benz(a)pyren, 20-Methylcholanthren, Chrysen, Benzanthracen, Benz(b)fluoranthen, und Dibenz(a,h)anthracen als sicher transformierend.
Benz(e)pyren zeigte einen dosisabhängigen Anstieg transformierter Zellen und wurde deshalb ebenfalls als karzinogen-verdächtig eingestuft.
Anthracen und Phenanthren, sowie das als Lösungsmittel benutzte DMSO waren bei fehlender Dosis-Wirkungsbeziehung negativ.
Die Resultate stimmen mit den aus der Literatur bekannten Ergebnissen bezüglich der Kanzerogenität verschiedener PCK überein.

7. LITERATUR

AMES B.N., DURSTON W.W., YAMASAKI E. und LEE F.D.,
Carcinogens are mutagens: a simple test system combining liver homogenates for activation and bacteria for detection. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973) 2281

AMES B.N., McCANN J. und YAMASAKI E.,
Methods for detecting carcinogens and mutagens with the salmonella/mammalian microsome mutagenicity test. Mut. Res. 31 (1975) 347

ANDREWS A.W., THIBAULT L.H. und LIJINSKY W.,
The relationship between carcinogenicity and mutagenicity of some polynuclear hydrocarbons.
Mut. Res. 51 (1978) 311

BARRETT J.C. und TS'O P.O.P.,
Evidence for the progressive nature of neoplastic transformation in vitro. Proc. Nat. Acad. Sci 75 (1978) 3671

BASLER A. und RÖHRBORN G.,
Mutagenicity of polycyclic hydrocarbons, in Tumor of early life in man and animals, L. Severi Ed., VIth Perugia Quadr. Int. Conf. Cancer (1978), p. 843

BERENBLUM I. und SHUBIK P.,
An experimental study of the initiating state of carcinogenesis, and a re-examination of the somatic cell theory of cancer. Br. J. Cancer 3 (1949) 109

BERGWALD Y. und SACHS L.,
In vitro transformation of normal cells to tumor cells by carcinogenic hydrocarbons. J. Natl. Cancer Inst. 35 (1965) 641

BLUMBERG P.M., DRIEDGER P.E. und ROSSOW P.W.,
Effect of phorbol ester on a transformation sensitive surface protein of chick fibroblasts. Nature 264 (1976) 446

BRIDGES B.A.,
Short term tests for carcinogens. Nature 261 (1976) 195

BROCK N. und HOHORST H.J.,
Über die Aktivität von Cyclophosphamid in vivo und in vitro. Arzn.Forsch. 13 (1963) 1021

COURTENAY V.D., SELBY P.J., SMITH L.E., MILLS J. und PECKHAM M.J.,
Growth of human tumour cell colonies from biopsies using two soft-agar technics. Br. J. Cancer 38 (1978) 77

DI PAOLO J.A., DONOVAN P.J. und NELSON R.L.,
Transformation of hamster cells in vitro by polycyclic hydrocarbons without cytotoxicity. Proc. Nat. Acad. Sci. 68 (1971) 2958

DI PAOLO J.A., NELSON R.L., DONOVAN P.J. und EVANS C.H.,
Host mediated in vivo-in vitro assay for chemical carcinogenesis. Arch. Pathol. 95 (1973) 380

DI MAYORCA G., GREENBLATT M., TRAUTHEN Th., SOLLER A. und GIORDANO R.
Malignant transformation of BHK 21/Cl 13 cells in vitro by nitrosamines-a conditional state.
Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973) 46

DRUCKREY H. und SCHMÄHL D.,
Cancerogene Wirkung von Anthracen. Naturwiss. 42 (1955) 159

EARLE W.R., SHILLING E.L., STARK TH., STRAUS N.P., BROWN M.F. und SHELTON E.,
Production of malignancy in vitro 4. The mouse fibroblast cultures and changes seen in the living cells.
J. Nat. Cancer Inst. 4 (1943) 165

ENGST R. und FRITZ W.,
Contamination of food with carcinogenic hydrocarbons of enviromental origin. Zakl. Hig. Rocz. Panstw. Zakl. Hig. 26 (1975) 113

FRADKIN A., JANOFF A., LANE B.P. und KUSCHNER M.,
In vitro transformation of BHK 21 cells grown in the presence of calcium chromate. Cancer Re. 35 (1975) 1058

FREEMAN A.E., WEISBURGER E.K., WEISBURGER J.H., WOLFORD R.G., MARYAK J.M. und HUEBNER R.J.,
Transformation of cell cultures as an indication of the carcinogenic potential of chemicals. J. Nat. Cancer Inst. 51 (1973) 799

FRITZ W.,
Extent and source of contamination of our food with carcinogenic hydrocarbons. Ernährungsforsch. 16 (1971) 547

FUSENIG E., AMER M.S., BOUKAMP P. und WORST P.K.M.,
Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells in vitro and in vivo.
Bull. Cancer 65 (1978) 271

HARTWELL J.L.,
Survey of compounds which have been tested for carcinogenic activity. US Public Health Service Publ. No 149, Washington DC (1951)

HEIDELBERGER C.,
Chemical carcinogenesis. Ann. Rev. Biochem. 44 (1975) 79

HENSCHLER D.,
Gesundheitsgefährdung durch krebserzeugende Arbeitsstoffe. Universitas 33 (1978) 1151

HOLLSTEINER M. und McCANN J.,
Short-term tests for carcinogens and mutagens.
Mut. Res. 65 (1979) 133

HOSAKA S., SUZUKI M. und SATO H.,
Leucocyte-like motility of cancer cells, with reference to the mechanism of extravasation in metastasis.
Gann. 70 (1979) 559

HUBERMANN E. und SACHS L.,
Cell-mediated mutagenesis of mammalian cells with chemical carcinogens. Int. J. Cancer 13 (1974) 326

HUBERMANN E. und SACHS L.,
Mutability of different genetic loci in mammalian cells by metabolically activated carcinogenic polycyclic hydrocarbons. Proc. Nat. Acad. Sci. 73 (1976) 188

IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of the chemical to man. Lyon, 3 (1973) 45
IARC Monographs .... 7 (1974) 245 bzw. 253
IARC Monographs 9 (1975) 135
IARC Monographs 10 (1976) 171

ISHII Y., ELLIOTT J.A., MISHRA N.K. und LIEBERMANN M.W.,
Quantitative studies of transformation of chemical carcinogens and ultraviolet radiation using a subclone of BHK 21Cl 13 syrian hamster cells.
Cancer Res.37 (1977) 2023

KAKUNAGA T. und KAMAHORA J.,
Properties of hamster embryonic cells transformed by 4-Nitroquinoline-1-oxide in vitro and their correlations with the malignant properties of the cells.
Biken J. 11 (1968) 313

KAKUNAGA T.
A quantitative system for assay of malignant transformation by chemical carcinogens using a clone derived from BALB 3T3. Int. J. Cancer 12 (1973) 464

KAKUNAGA T.
Neoplastic transformation of human diploid fibroblast cells by chemical carcinogens.
Proc. Nat. Acad. Sci. 75 (1978) 1334

KENNAWAY E.L. und HIEGER J.,
Carcinogenic substances and their fluorescence spectra.
Brit. Med. J. i. (1930) 1044

KENNAWAY E.L., KENNAWAY N.M. und WARREN F.L.,
The examination of Dimethylanthracenes for carcinogenic properties. Cancer Res. 2 (1942) 157

KRAHN D.F. und HEIDELBERGER C.,
Liver homogenate-mediated mutagenesis in chinese hamster V 79 cells by polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxins. Mut. Res. 46 (1977) 27

LAERUM O.D. und RAJEWSKY M.F.,
Neoplastic transformation of fetal rat brain cells in culture after exposure to Ethylnitrosourea in vivo.
J. Natl. Cancer Inst. 55 (1975) 1177

LAGE-DAVILA A. und MONTAGNIER L.
Studies of a large transformation-increased membrane protein in the BHK 21 cell system. Biochim. Biophys. Acta 550 (1979) 435

LEHR R. und JERINA D.,
in Carcinogenesis- a comprehensive survey, Jone P.W. und Freudenthal R.J. Eds., Raven Press NY, 3 (1978) 231-241

LIJINSKY W. und SAFFIOTTI U.,
Relationship between structure and skin tumourigenic activity among hydrogenated derivatives of several polycyclic aromatic hydrocarbons. Ann. Ital. Derm. Chem. Sper. 19 (1965) 34

MAJOR E. und DI MAYORCA G.,
Malignant transformation of BHK 21 Cl 13 cells by BK virus - a human papovavirus. Proc. Nat. Acad. Sci. 70 (1973) 3210

McCANN J., CHOI E., YAMASAKI E. und AMES B.N.,
Detection of carcinogens as mutagens in the salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. Proc. Nat. Acad. Sci. 72 (1975) 5135

MISHRA N.K., WILSON C.M., PANT K.J. und Thomas F.O.,
Simultaneous detemination of cellular mutagenesis and transformation by chemical carcinogens in Fisher rat embryo cells. J. Tox. Env. Health 4 (1978) 79

MONTESANO R., SAINT VINCENT L. und TOMATIS L.,
Malignant transformation in vitro of rat liver cells by Dimethylnitrosamine and N-methyl-N'-Nitro-N-nitroso-guanidine. Br. J. Cancer 28 (1973) 215

NCI Techn. Rep. Ser. No 1 (1976), Guidelines for Carcinogen bioassay in small rodents.

OSBORNE M.R.,
Diolepoxides- the key to hydrocarbon carcinogenesis. Trends in Biochem. Sci. 4 (1979) 213

PARODI S. und BRAMBILLA G.,
Relationship between mutation and transformation frequencies in mammalian cells treated in vitro with chemical carcinogens. Mut. Res. 47 (1977) 53

PIENTA R.J., POILEY J.A. und LEBHERZ III W.B.,
Morphological transformation of early passage golden syrian hamster embryo cells derived from cryopreserved primary cultures as a reliable in vitro bioassay for identifying diverse carcinogens. Int. J. Cancer 19 (1977) 642

PIENTA R.J. in Carcinogens: Identification and mechanisms of action, Griffin A.C. und Shaw C.R. Eds., Raven Press NY (1979) p.121

POTT P.,
Cancer scroti in chirurgical observations, Hawes, Clarke & Collins, London (1775), p. 63

PURCHASE I.F.H., LONGSTAFF E., ASHBY J., STYLES J.A., ANDERSON D., LEFEVRE P.A. und WESTWOOD F.R.,
Evaluation of six short term tests for detecting organic chemical carcinogens and recommendations for their use.
Nature 264 (1976) 625

PURCHASE I.F.H., et al.,
An evaluation of 6 short-term tests for detecting carcinogens. Br. J. Cancer 37 (1978) 873

RICHTER-REICHHELM H.B. und EMURA M.,
Toxizität und Carcinogenität von Benz(a)pyren an Lungenzellkulturen und Tracheastückchen.
Staub, Reinhaltung Luft 38 (1978) 247

ROGAN E., ROTH R., KATOMSKI P., BENDERSON J. und CAVALIERI E.,
Binding of Benzo(a)pyrene at the 1,3,6-positions to nucleic acids in vivo on mouse skin and in vitro with rat liver microsomes and nuclei.
Chem.-Biol. Interact. 22 (1978) 35-51

ROSZINSKY-KÖCHER G., BASLER A. und RÖHRBORN G.,
Induction of sister-chromatid exchanges in vivo.
Mut Res. 66 (1979) 65

SCRIBNER J.D., Tumor initiation by apparently noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbons.
J. Natl. Cancer Inst. 50 (1973) 1717

SCHÄFER-RIDDER M.,
Carcinogenese durch polycyklische aromatische Kohlenwasserstoffe.
Nachr. Chem. Tech. Lab. 27 (1979) 4-6

SCHMÄHL D.,
Prüfung von Naphtalin und Anthracen auf cancerogene Wirkung an Ratten.
Zeitschr. f. Krebsforsch. 60 (1955) 697

SCHMÄHL D. und HABS M.,
A critical review of the present state of the testing for carcinogenic potentials. in:
The evaluation of toxicol. data for the protection of public health, Proc. of the Int. Colloquium Luxemburg 1976. Hunter W.J. und Smeets J.G. Eds.,
Pergamon Press Oxfort (1977) p. 59

SCHRAMM T.,
Kurzzeittests als eine Stufe im Rahmen der Prüfung von Substanzen auf kanzerogene Wirkung.
Arch. Geschwulstforsch. 47 (1977) 567

SHABAD L.M., SOROKINA J.D., GROLUB N.I. und BOGOVSKI S.P.,
Transplacental effects of some chemical compounds on organ cultures of embryonic kidney tissue,
Cancer Re. 32 (1972) 617

SHELLABAGER C.J., STRAUB R.F., Effect of 3-Methylcholanthrene and fission neutron irradiation, given singly or combined, on rat mammary carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 48 (1972) 185

SHUBIK ph.,
Interpretation of test results in terms of significance to man, in Carcinogenesis testing of Chemicals.
L. Golberg Ed., CRC Press, Cleveland/Ohio 1974 p.45

SHUBIK ph.,
Identification of environ mental carcinogens: animal test models, in Carcinogens: Identification and Mechanisms of Action. Griffin A.C., Shaw C.R. Eds., Raven Press N.Y. (1979) p.37

STICH H.F.,
Review on short-term carcinogenicity tests
Can. J. Genet. Cytol. 17 (1975) 471

STOKER M. und MAC PHERSON J.,
Syrian hamster fibroblast cell line BHK 21 and its derivatives.
Nature 203 (1964) 1355

STRAUSS B.S.
Physical-chemical methods for the detection of the effect of mutagens on DNA, in: Chemical mutagens, principles and methods for their detection. E u. A Hollaender Eds. Plenum Press NY (1971) p. 145

STYLES J.A.,
A method for detecting carcinogenic organic chemicals using mammalian cells in culture.
Br. J. Cancer 36 (1977) 558

TRAUL K.A., KACHEVSKY V. und WOLFF J.S.,
A rapid in vitro assay for carcinogenicity of chem. substances in mammalian cells utilizing an attachement-independent endpoint. Int. J. Cancer 23 (1979) 193

TSANG W.G., GRIFFIN G.W.,
Metabolic activation of polynuclear aromatic hydrocarbons. Pergemon Press, Oxford (1979) p. 85

UMEDA M. und IYPE P.T.,
An improved expression of in vitro transformation rate based an cytotoxicity produced by chemical carcinogens.
Br. J. Cancer 28 (1973) 71

UMEZAWA K., HIRAKAWA T., TANAKA M., KATOH Y. und TAKAYAMA S.,
Statistical evaluation of Pienta's in vitro carcinogenesis assay. Toxicology Letters 2 (1978) 23

VAN DUUREN B.L., SIVAK A., GOLDSCHMIDT B.M. et al.,
Initiation activity of aromatic hydrocarbons in two-stage carcinogenesis.
J. Natl. Cancer Inst. 44 (1970) 1167

WESTWOOD F.R., LONGSTAFF E. und BUTLER W.H.,
Cellular progression of neoplasia in the subcutis of mice after implantation of 3,4-Benzpyrene.
Br. J. Cancer 39 (1979) 761

WOOD A.W. et al.,
Mutagenicity of metabolically activated Benzo(a)anthracene-3,4-Dihydrodiol: Evidence for bay region activation of carcinogenic polycyclic hydrocarbons.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 72 (1976) 680

WYNDER E.L., HOFFMANN D.,
A study of tobacco carcinogenesis VII, The role of higher polycyclic hydrocarbons.
Cancer 12 (1959) 1079

ZBINDEN G. und SCHLATTER CH.,
New approaches to mutagenicity and carcinogenicity testing in in vivo mammalian systems in Chemical Toxicology of Food, Galli C.l., Paoletti R. und Vettorazzi Eds, Elsevier/North-Holland (1978) p. 153

8. TABELLEN mit Einzelwerten (Klonzahlen)

Ethylmethansulfonat, ink. 3h mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	52 55	53,5	100	69 62	65,5	65	41 34	37,5	100	60 58	59	59
125	43 40	41,5	77,5	74 86	80	103	41 47	44	100	119 96	107,5	107
250	37 42	39,5	73,8	67 77	72	97	39 38	38,5	100	101 118	109,5	109
500	31 28	29,5	55	156 138	147	267	37 33	35	93	106 101	103,5	111
750	19 26	22,5	42	123 141	132	314	29 24	26,5	71	83 133	108	153
1000	20 15	17,5	32,7	104 123	113,5	347	13 21	17	45	127 127	127	280
1500	4 2	3	5,6	152 120	136	2428	3 4	3,5	9,3	68 53	60,5	650

Methylmethansulfonat, ink. 3h mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	44 52	48	100	49 54	51,5	51	38 49	43,5	100	60 60	60	60
1	45 48	46,5	97	68 62	65	67	38 40	39	90	63 67	65	73
10	42 49	45,5	95	88 78	83	87	43 46	44,5	100	64 97	80,5	80
25	43 43	43	89	50 69	59,5	67	40 36	38	87	84 74	79	90
50	26 18	22	46	75 89	82	179	16 12	14	32	113 98	105,5	329
100	4 3	3,5	7	93 75	84	1150	0 1	0,5	1,1	9 8	8,5	772

Cyclophosphamid ink.3h mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	x̄	%	transformers x	x̄	Korr.	survivors x	x̄	%	transformers x	x̄	Korr.
H_2O	63 49	66	100	46 69	57,5	57	48 50	49	100	68 60	64	64
0.1	61 34	47,5	72	62 91	76,5	133	62 56	59	100	108 120	114	114
1	5 11	8	12	66 68	67	558	32 64	58	100	93 125	109	109
5	0 0	0	0	31 26	28,5		--			--		
10	0 0	0	0	12 20	16		42 68	55	100	111 114	112,5	112
100	0 0	0	0	0 0	0		58 64	61	100	64 88	76	76
1000	0 0	0	0	0 0	0		16 18	17	34	47 53	50	147

Mitomycin C ink.3h mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	x̄	%	transformers x	x̄	Korr.	survivors x	x̄	%	transformers x	x̄	Korr.
H_2O	64 58	61	100	29 22	25,5	25	45 55	50	100	22 20	21	21
0.001	48 53	51,5	84	35 35	35	42	50 43	46,5	93	29 27	28	30
0.01	50 48	49	80	49 55	52	65	30 43	36,5	73	40 31	35,5	49
0.1	37 36	36,5	72	43 43	43	72	29 23	26	52	38 34	36	69
1.0	20 22	21	34	48 48	48	141	0 0	0	0	0 0	0	0
2.0	0 3	1,5	2,5	2 10	6	240	0 0	0	0	0 0	0	0

9,10-Dimethylanhtrazen, ink.6h mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	92 107	99,5	100	55 62	58,5	58	110 113	111,5	100	57 60	59,5	59,5
0.025	92 92	92	92	85 82	83,5	90	117 109	112	100	100 102	101	101
0.25	97 80	88,5	89	66 56	60	68	97 110	103,5	93	92 60	75,5	81
2,5	80 90	85	85	103 101	102	119	101 99	100	90	90 102	96	107
25	32 39	35,5	36	77 71	74	208	93 100	96,5	86	120 136	128	148
250	4 6	5	5	55 23	39	780	61 43	52	47	35 4	19,5	42

Benzo(a)pyren, ink.18h. mit S-9							ohne S-9					
Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	57 51	54	100	46 45	45,5	45	80 40	60	100	37 39	38	38
0.025	45 45	45	83	61 61	61	73	52 52	52	87	31 26	28,5	33
0.25	29 29	29	54	96 77	86,5	160	48 48	48	80	29 35	32	40
2.5	2 4	3	5	1 19	10	200	42 34	38	63	21 26	23,5	37
25	0 0	0	0	0 0	0		21 49	35	58	23 20	21,5	37
250	0 0	0	0	0 0	0	0	32 24	28	47	14 18	16	34

Benz(e)pyren ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	50	48	100	63	42,5	42
	46			22		
0.025	49	50	100	32	35,5	35
	51			39		
0.25	53	47	98	56	54	55
	41			52		
2.5	47	48	100	57	55	55
	49			53		
10	31	33,5	70	58	51,5	74
	36			45		
25	17	17	35	34		97
250	0	0	0	0		0

Chrysen ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	92	86	100	30	27	27
	80			24		
0.025	85	85	98	26	23,5	24
	85			21		
0.25	61	63	73	45	46,5	64
	65			48		
2.5	41	43	50	44	46	92
	45			48		
25	17	14	12	25	25	208
	11			25		
250	7	6,5	7,5	15	9,75	130
	6			4		

Benz(a)anthracen ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	38	38,5	100	33	35,5	36
	39			38		
0.025	42	41,5	100	47	32	32
	39			17		
0.25	31	33	86	50	53,5	62
	35			57		
2.5	25	25	65	57	58	89
	25			59		
10	10	9,5	25	27	25,5	102
	9			24		
25	0	0	0	0	0	0
	0			0		

DMSO ink. 18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
0	40	40	100	36	36	36
	40			36		
10	38	38,5	96	33	38,5	40
	39			44		
25	40	40	100	32	32	89
50	29	29	60	3	3	5
	0			0		
100	0	0	0	0	0	0
	0			0		
200	0	0	0	0	0	0
	0			0		

20-Methylcholanthren ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	86	86,5	100	48	49	49
	87			50		
0.025	75	74	85	65	65	76
	73			65		
0.25	79	79,5	92	92	89,5	97
	80			87		
2.5	36	44	51	81	81,5	160
	52			82		
25	9	11,5	13	31	27	208
	14			23		
250	6	6	7	12	13,5	193
	6			15		

Phenanthren ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	52	47	100	32	32	32
	42			32		
0.025	48	48	100	34	33,5	34
	48			33		
0.25	62	54	100	35	30,5	31
	46			26		
2.5	30	32	70	33	31	44
	34			29		
25	25	24	51	21	16,5	32
	23			12		
250	0	0	0	0	0	0
	0			0		

Anthracen ink.18h mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	48	46	100	32	32	32
	44			32		
0.025	62	50	100	30	30	30
	38			30		
0.25	46	44	95	39	34,5	36
	42			30		
2.5	36	38	83	35	32	38
	40			29		
25	28	26	56	24	26	46
	24			28		
250	4	9	20	0	7	35
	14			14		

Dibenz(a,h)anthracen ink.18 mit S-9

Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	48	46	100	36	32,5	32,5
	44			29		
0.025	46	43	93	30	34	37
	40			38		
0.25	38	39	85	37	35	41
	40			33		
2.5	40	41	89	46	48,5	55
	42			51		
25	34	37	80	48	49	61
	40			50		
250	17	21	46	38	36,5	79
	25			35		

Benz(b)fluoranthen ink.18h mit S-9						
Konz. µg/ml	survivors x	$\bar{x}$	%	transformers x	$\bar{x}$	Korr.
DMSO	48 44	46	100	32 32	32	32
0.025	60 44	52	100	29 37	33	33
0.25	40 38	39	85	50 40	45	53
2.5	24 28	26	57	56 32	44	77
25	18 16	17	34,7	22 26	24	69
250	6 6	6	13	17 11	14	108

Herrn Prof. Dr. G. RÖHRBORN danke ich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes.

LEBENSLAUF

Name:	Dr. Wolfgang Greb
geboren:	24. 7. 46 in Betzdorf/Sieg
Eltern:	Erich Greb, Kaufmann, und Hilde Greb geb. Caster
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	verheiratet seit 1976 mit Dr. Monika Greb, geb. Vielhaber, Biologin

Werdegang:

1953 - 1957	Kath. Volksschule Betzdorf
1957 - 1966	Staatl. Gymnasium Betzdorf, naturwiss. Zweig
SS 66 - SS 73	Studium der Chemie, Universität Bonn
6. 8. 71	Diplom, Note: ausgezeichnet
1. 6. 73	Promotion zum Dr. rer. nat. Dissertation Note: ausgezeichnet Leitung: Prof. Dr. F. Korte, Thema: Metabolismus niedrig chlorierter Biphenyle im Rhesusaffen und in vitro Umwandlung durch Leberenzyme.
1972	Zum exp. Teil der Arbeit einjähriger Aufenthalt am Institue of Experimental Pathology and Toxicology, Albany Med. Coll. Albany NY USA. (Leiter: Prof. F. Coulston und Prof. L. Golberg)
1. 9. 73	Eintritt in Fa. Henkel KGaA, Abt. Toxikologie. Arbeitsgebiete: Pharmakokinetik u. Metabolismus

SS 75 - SS 76	Medizinstudium, Universität Köln
27. 8. 76	Ärztliche Vorprüfung
WS 76 -	Fortsetzung an der Universität Düsseldorf
26. 8. 77	Ärztliche Prüfung Teil I
21. 8. 79	Ärztliche Prüfung Teil II